

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium úlohy biliverdinu jako antioxidační látky v rostlinných modelech

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Petra Vašíčková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 25.4.2018

Bc. Petra Vašíčková

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce panu doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a čas věnovaný zpracování teoretické i experimentální části diplomové práce.

Velmi ráda bych poděkovala panu Mgr. Tiborovi Béresi, Ph.D. za pomoc, ochotu a odborné rady při vypracování analytické části diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Tereze Tiché, Ph.D. a dalším zaměstnancům katedry biochemie za vstřícný přístup a cenné rady při vypracování experimentální části diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Vašíčková
Název práce	Studium úlohy biliverdinu jako antioxidační látky v rostlinných modelech
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na biliverdin (BV) a metody jeho stanovení. V úvodu práce jsou shrnuty funkce hemu u rostlin. Dále je pozornost věnována funkcím BV u rostlin se zaměřením na biosyntetické dráhy BV - vznik BV degradací hemu katalyzovanou hemoxygenasou (HO) a využití BV v syntéze fytochromů. Následující kapitoly se zabývají úlohou BV ve stresových podmínkách, kde se předpokládá úloha BV jako antioxidantu. Závěrečné kapitoly shrnují doposud publikované metody stanovení BV.

V rámci praktické části byla zavedena a testována metoda fluorimetrické kvantifikace BV, která má nízkou citlivost pro stanovení BV v rostlinných vzorcích. Byla zavedena UHPLC-MS/MS metoda analýzy BV za využití syntetického standardu BV, včetně citlivé metody kvantifikace s využitím deuteriem-značeného BV. Optimalizovaná metoda UHPLC-MS/MS byla aplikována pro stanovení BV v rostlinných vzorcích. Byl pozorován vliv induktorů HO na vývoj kořenového systému, aktivitu HO a obsah BV ve vzorcích kořenových částí *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom. Byl pozorován vliv abiotického stresu na vývoj, aktivitu HO, obsah BV a peroxidaci lipidů v kořenových a nadzemních částech semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom a *S. lycopersicum* cv. Amateur. Dále byla sledována interakce BV s reaktivními formami dusíku *in vitro*. Výsledky práce potvrzují změny hladin BV v kořenech rostlin v souvislosti se změnami

aktivity HO a vlivem stresových podmínek. Pro objasnění funkcí BV v kořenech rostlin bude potřeba dalšího výzkumu.

Klíčová slova	Biliverdin, hemoxygenasa, <i>Solanum lycopersicum</i> , ultravysokotlaká kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, hemin, abiotický stres, oxidační stres
Počet stran	93
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Bc. Petra Vašíčková
surname

Title Study of biliverdin role as antioxidant compound in
plant models

Type of thesis Diploma

Department Department of biochemistry

Supervisor doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

The year of presentation 2018

Abstract

The diploma work is focused on biliverdin (BV) and methods of its determination in its theoretical part. The introduction summarizes function of heme in plants. Further attention is paid to functions of BV in plants with a focus on biosynthetic pathways - the formation of BV by heme degradation by catalysis of heme oxygenase (HO) and the use of BV in phytochrome synthesis. The following part focuses on role of BV in stress conditions where the role of BV is assumed as an antioxidant. The final part summarizes methods of BV determination which have been published up to now.

In practical part the method of fluorimetric quantification was introduced and tested which has a low sensitivity for BV determination in plant samples. UHPLC-MS/MS method of BV analysis was introduced using the synthetic standard of BV including sensitive method of quantification using deuterium-labeled standard of BV. Optimized UHPLC-MS/MS method was used for BV determination in plant samples. Effect of HO inducers was observed for development of root system, HO activity and BV content in root samples of *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom. Effect of abiotic stress was observed for development, HO activity, BV content and lipid peroxidation in root and overground part of seedlings of *S. lycopersicum* cv. MicroTom and *S. lycopersicum* cv. Amateur. Further, interaction of BV with reactive nitrogen species was observed *in vitro*. Results of work confirm changes of BV levels in roots of plants which are in

connection with changes of HO activity under influence of stress conditions. Further research is needed for clarification of BV function in plant roots.

Keywords	Biliverdin, heme oxygenase, <i>Solanum lycopersicum</i> , ultra-high pressure liquid chromatography, mass spectrometry, hemin, abiotic stress, oxidation stress
Number of pages	93
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Katabolismus hemu	3
2.2	Biliverdin v rostlinách	7
2.2.1	Biosyntéza a přeměny biliverdinu.....	7
2.2.2	Syntéza fytochromů	9
2.2.3	Úloha biliverdinu ve stresových podmínkách.....	13
2.2.3.1	Biliverdin v živočišných tkáních	13
2.2.3.2	Biliverdin v rostlinných pletivech	15
2.2.3.3	Biliverdin a stres	16
2.2.4	Interakce biliverdinu s ROS a RNS	17
2.3	Přehled metodiky.....	21
2.3.1	Stabilita a extrakce biliverdinu.....	21
2.3.2	Spektrální metody kvantifikace biliverdinu	23
2.3.3	Metody kvantitativní analýzy biliverdinu	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Materiál a chemikálie	27
3.1.1	Rostlinný materiál	27
3.1.2	Použité chemikálie	27
3.2	Přístrojové vybavení.....	28
3.3	Metody.....	29
3.3.1	Příprava pufrů, roztoků a médií	29
3.3.1.1	Pufr pro přípravu kultivačního média (25 mM HEPES, pH 7,4)	29

3.3.1.2	Mobilní fáze pro UHPLC (20 mM roztok hydrogenuhličitanu amonného).....	29
3.3.1.3	Extrakční pufr pro stanovení aktivity hemoxygenasy (0,1 M draselno-fosfátový pufr s 2 mM MgCl ₂ , pH 7,4).....	29
3.3.1.4	Příprava substrátů pro stanovení aktivity hemoxygenasy.....	30
3.3.1.5	Reakční pufr pro stanovení aktivity hemoxygenasy.....	30
3.3.1.6	Roztok 200 μM bilirubinu	30
3.3.1.7	Roztok 0,5 mM heminu	30
3.3.1.8	Roztok 1 mM hydrogensulfidu sodného.....	31
3.3.1.9	Roztok 10 mM chloridu kademnatého.....	31
3.3.1.10	MS médium pro rajčata.....	31
3.3.1.11	Roztoky pro stanovení peroxidace lipidů	31
3.3.1.12	Extrakční činidlo pro stanovení peroxidace lipidů	32
3.3.1.13	Zásobní 10 μM roztok biliverdinu	32
3.3.1.14	Roztoky látek uvolňujících RNS	32
3.3.1.15	Roztoky pro fluorimetrickou kvantifikaci biliverdinu.....	32
3.3.2	Sterilizace a klíčení semen	32
3.3.3	Kultivace semenáčků rajčat na pevném agarovém MS médiu	33
3.3.4	Kultivace semenáčků rajčat na filtračním papíru.....	33
3.3.5	Příprava rostlinných vzorků	34
3.3.6	Stanovení množství proteinů ve vzorku Bradfordovou metodou	35
3.3.7	Stanovení aktivity hemoxygenasy	35
3.3.8	Stanovení peroxidace lipidů.....	35
3.3.9	Metoda UHPLC-MS/MS analýzy biliverdinu	36
3.3.10	Kalibrace UHPLC-MS/MS metody za využití interního standardu biliverdinu-d ₄	37
3.3.11	Analýza interakce biliverdinu s RNS.....	37

3.3.12	Fluorimetrická kvantifikace biliverdinu.....	37
3.3.13	Statistické vyhodnocení dat.....	38
4	VÝSLEDKY	39
4.1	Stanovení interakce biliverdinu s RNS	39
4.2	Analýza obsahu biliverdinu v rostlinném materiálu.....	40
4.2.1	Fluorimetrická kvantifikace biliverdinu.....	40
4.2.2	Vývoj a optimalizace metody UHPLC-MS/MS analýzy biliverdinu	43
4.2.3	Kalibrace UHPLC-MS/MS metody za využití interního standardu biliverdinu-d ₄	47
4.2.4	Stabilita biliverdinu.....	48
4.2.5	Vliv přípravy vzorku na obsah biliverdinu	49
4.3	Vliv induktorů hemoxygenasy na aktivitu hemoxygenasy, hladiny biliverdinu a vývoj kořenového systému semenáčků rajčete	50
4.3.1	Stanovení aktivity hemoxygenasy	50
4.3.2	Stanovení koncentrace biliverdinu.....	51
4.3.3	Vývoj kořenového systému.....	52
4.4	Vliv abiotického stresu na vývoj kořenového systému, aktivitu hemoxygenasy a hladinu biliverdinu v semenáčcích rajčete	53
4.4.1	Vliv abiotického stresu na vývoj kořenového systému.....	53
4.4.2	Vliv abiotického stresu na obsah proteinů	59
4.4.3	Vliv abiotického stresu na aktivitu hemoxygenasy.....	61
4.4.4	Vliv abiotického stresu na obsah biliverdinu.....	63
4.4.5	Vliv abiotického stresu na peroxidaci lipidů.....	65
5	DISKUZE	68
5.1	Stanovení interakce biliverdinu s RNS	68
5.2	Analýza obsahu biliverdinu v rostlinném materiálu.....	68
5.2.1	Fluorimetrická kvantifikace biliverdinu.....	68

5.2.2	Vývoj a optimalizace metody UHPLC-MS/MS analýzy biliverdinu	69
5.2.3	Kalibrace UHPLC-MS/MS metody za využití interního standardu biliverdinu-d ₄	71
5.2.4	Stabilita biliverdinu.....	72
5.2.5	Vliv přípravy vzorku na obsah biliverdinu	73
5.3	Vliv induktorů hemoxygenasy na aktivitu hemoxygenasy, hladiny biliverdinu a vývoj kořenového systému semenáčků rajčete	73
5.4	Vliv abiotického stresu na vývoj kořenového systému, aktivitu hemoxygenasy a hladinu biliverdinu v semenáčcích rajčete	75
6	ZÁVĚR.....	85
7	LITERATURA	87
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	93

CÍLE PRÁCE

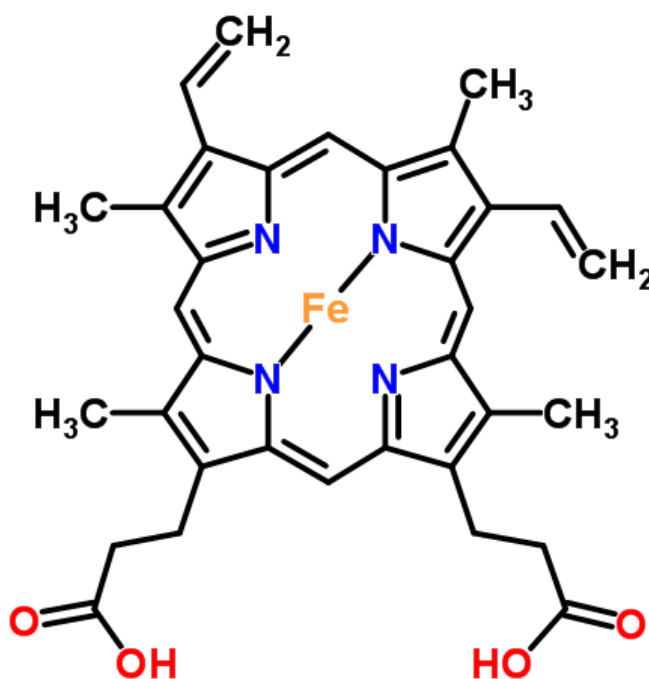
Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši shrnující funkce biliverdinu u rostlin, známé dráhy biosyntézy včetně obranných odpovědí ve stresových podmínkách.

Cílem experimentální části diplomové práce bylo zavést metodu kvantifikace biliverdinu metodou HPLC analýzy na reverzní fázi s využitím syntetického standardu a ověřit její použití pro rostlinné vzorky. Dalším cílem byla aplikace metody pro sledování hladiny biliverdinu v rostlinách vystavených abiotickému stresu.

1 ÚVOD

Hem je vysoce konzervativní rovinná struktura, která je životně důležitá pro většinu organismů, kde se uplatňuje zejména při transportu kyslíku, oxidační katalýze a přenosu elektronů dýchacího řetězce. Základem struktury hemu je porfyrinový kruh obsahující čtyři atomy dusíku, které koordinují centrální atom Fe^{2+} (Obr. 1). V živých organismech se hem váže na proteiny za vzniku hemoproteinů. V hemoproteinech se hem uplatňuje jako prostetická skupina, mající širokou škálu využití. Využití hemu je striktně dáno vazbou axiálních ligandů na jeho strukturu, tudíž strukturně odlišné skupiny hemoproteinů mají zcela rozdílné funkce a nemohou se vzájemně nahradit. V případě hemoglobinu a myoglobinu je hlavní funkcí hemu vazba a přenos plynů, především kyslíku. Ve skupině enzymů cytochromu P450, které zodpovídají za metabolismus cizorodých látek, hem váže vodu a účastní se hydroxylace a dalších reakcí. V případě velké skupiny redoxních enzymů je hem využíván jako katalyzátor přenosu elektronů (Balk a Schaedler, 2014). Molekula hemu se podílí i na signální transdukci, jelikož je součástí guanylátcyklasy (GC; EC. 4.6.1.2) nebo NOsyntasy (NOS; EC 1.14.13.39). Hem se v organismech může vyskytovat také jako volný hem, který je ale vysoce nerozpustný. Volný hem má funkci regulační molekuly. Koncentrace a intracelulární lokalizace volného hemu, v cytosolu nebo jádře buňky, ovlivňuje transkripci, translaci, degradaci a stabilitu hemoproteinů (Ponka, 1999). Přenos hemu přes membrány je aktivní a je zajištěn transportéry, o kterých prozatím nejsou jednotné informace. Pasivní přenos hemu difuzí není možný z těchto důvodů. Tím prvním je fakt, že hem je lipofilní povahy a akumuluje se v lipidové dvojvrstvě membrán. Dalším důvodem je přítomnost dvou karboxylových skupin ve struktuře hemu, které molekule udělují záporný náboj (Krishnamurthy *et al.*, 2007; Balk a Schaedler, 2014). Koncentrace volného hemu a hemoproteinů musí být v organismu udržována na určité hladině. Pokud by došlo k překročení daného limitu, byl by hem cytotoxický, jelikož katalyzuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (Heinemann *et al.*, 2008). Z tohoto důvodu je v organismu udržována stabilní nízká koncentrace hemu, která je současně výhodná i k ochraně proti bakteriím. Obranný princip je založen právě na toxicitě hemu (Anzaldí a Skaar, 2010). Cytotoxicita hemu je způsobena atomem Fe^{2+} nacházejícím se v centru struktury porfyrinového kruhu. Ionty přechodných kovů jsou zdrojem poškození mnoha významných buněčných struktur, kterými jsou DNA, bílkoviny, cytoskelet nebo membrány (Maines a Kappas, 1975; Solar *et al.*, 1990;

Chiabrando *et al.*, 2014). K minimalizaci rizika oxidačního poškození je zvýšená hladina hemu regulována nejen na úrovni genové exprese, ale i enzymaticky. Enzymová regulace spočívá v rovnováze mezi biosyntézou a katabolismem hemu. Počáteční molekulou biosyntézy hemu je kyselina 5-aminolevulová (ALA), která je syntetizována za katalýzy enzymem ALAsyntasa (ALAS; EC 2.3.1.37). ALAS je enzymem regulující celou syntézu hemu. Je-li hemu dostatek, je ALAS inhibována produktem enzymové reakce, kterou je ALA. Je-li hem syntetizován, ALA se spotřebovává a ALAS je aktivována nedostatkem produktu enzymové reakce (Ponka, 1999). Dále je hladina hemu regulována dostupností železa v organismu. Nízká koncentrace volného železa v organismu je velmi hlídána, jelikož se účastní Fentonovy reakce vedoucí ke tvorbě škodlivých radikálů. I přes svoji přechodnou povahu je atom železa důležitý pro syntézu Fe-proteinů a významně se uplatňuje při přenosu elektronů. Hem je degradován za tvorby Fe^{2+} a hladina hemu klesá. Pokles koncentrace hemu spustí kaskádu reakcí vedoucí k syntéze hemu (Balk a Schaedler, 2014).

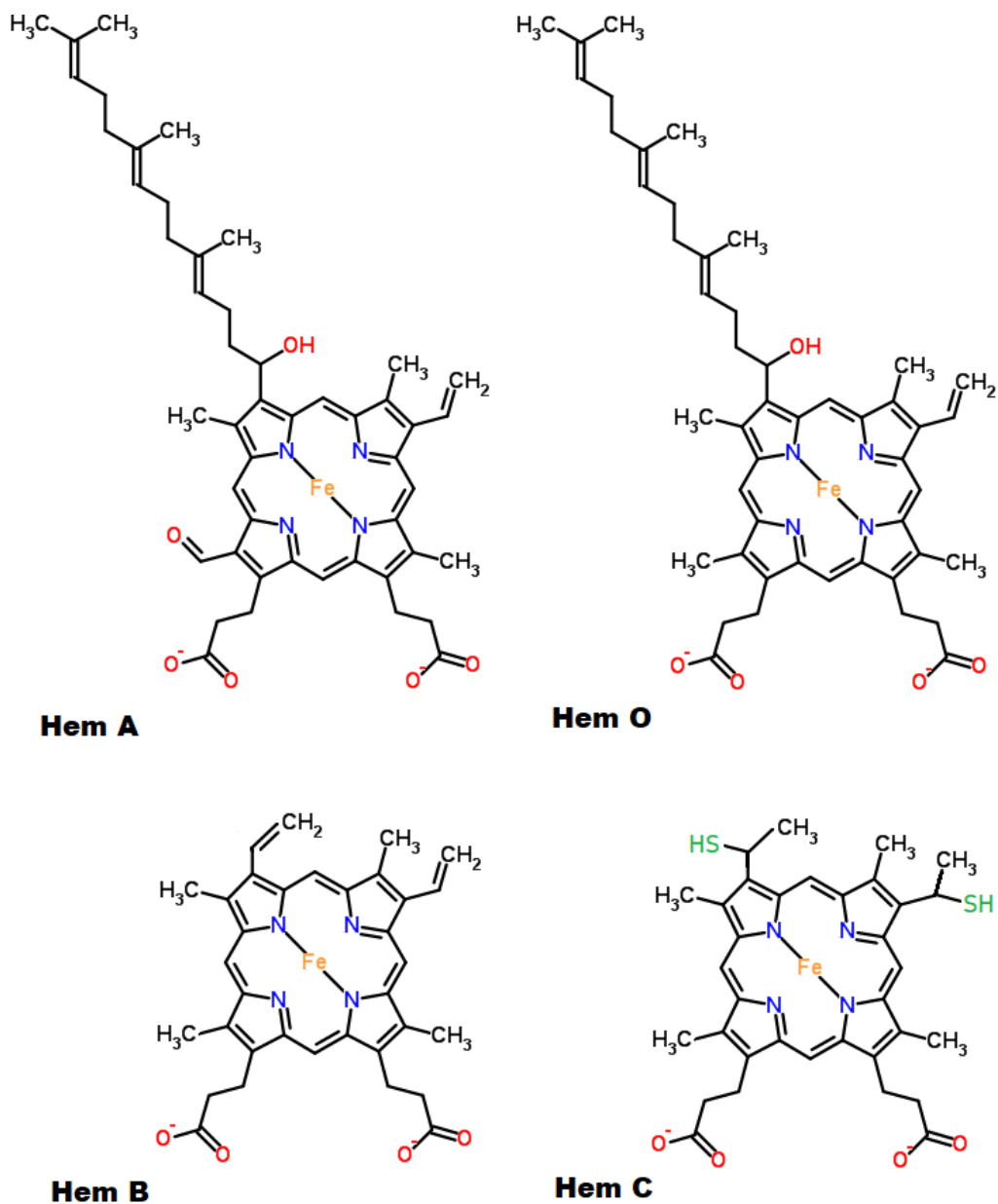


Obr. 1 Struktura hemu. Je tvořena porfyrinovým kruhem skládajícím se ze čtyř pyrolů s navázanými substituenty. V centru kruhu se nachází atom Fe^{2+} , který je zodpovědný za cytotoxicitu této molekuly (převzato z Chempidder).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Katabolismus hemu

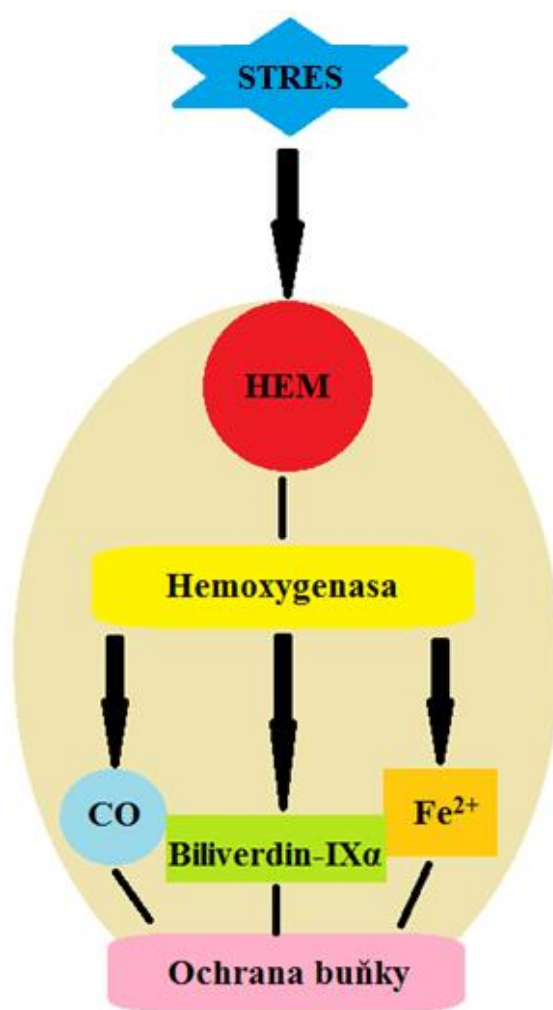
V živých organismech bylo identifikováno několik typů hemu: hem A, hem B, hem C a hem O. Tyto struktury se liší funkčními skupinami vázanými na uhlících 3, 8 a 18 tetrapyrrolového jádra (Obr. 2) Nejvíce zastoupená je struktura hemu B od níž jsou odvozené další deriváty hemu: hem I, hem m, hem D a hem S (Wikipedia). Hem B je součástí proteinů s funkcí přenosu plynů a skupiny enzymů peroxidasa. Hem A je součástí skupiny cytochromů a. Hem A společně s hemem C jsou součástí cytochromu c oxidasa (COX; EC 1.9.3.1.). COX je významný enzymový komplex dýchacího řetězce uložený v membráně mitochondrií. Využívá oxidaci cytochromu c ke tvorbě protonového gradientu skrz membránu. Významnou roli hraje cytochrom c při apoptóze. Ta je vyvolána akumulací cytochromu c obsahující hem C v cytoplazmatické membráně. Hem O se vyskytuje pouze u bakterií a má stejné funkce jako hem A v dýchacím řetězci. Hem A, hem B a hem C se vyskytují jak u živočichů, tak u rostlin a plní stejné, výše zmíněné funkce. V rostlinách se navíc hem vázaný v cytochromech účastní fotosyntézy, kde plní roli přenašeče elektronů. Současně jsou změny koncentrací volného hemu v plastidech pro buňku informací o jejich stavu. Pokud je funkce plastidů narušena, dochází k akumulaci volného hemu, která spustí signální dráhu vedoucí k zablokování exprese jaderného genu (Espinosa *et al.*, 2012; Wikipedia).



Obr. 2 Struktury hemu vyskytující se v živých organismech. Oproti základní struktuře hemu B se ostatní struktury liší modifikacemi na uhlících 3, 8 a 18. Pro hem A a O je typická vazba farnasenu na uhlíku 3. Od sebe se tyto struktury liší funkční skupinou na uhlíku 18, kde hem A má navázanou formylovou skupinu, zatímco hem O methylovou skupinu. Hem C má na uhlících 3 a 8 navázané zbytky cysteinu (upraveno dle Chemspider).

Katabolismus hemu zajišťuje enzym hemoxygenasa (HO; EC 1.14.99.3). HO je enzym vyskytující se ve všech živých organismech. Jak u živočichů, tak i v rostlinných systémech má svoji nezastupitelnou roli, kterou je katalýza degradace hemu na

biliverdin-IX α , Fe²⁺ a oxid uhelnatý. Produkty degradace hemu mají v živých organismech významnou roli, jsou zapojeny do signálních a obranných mechanismů nebo biosyntetických drah (Obr. 3). Exprese HO je regulována mnoha signály. Zvýšená koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) vede k její zvýšené produkci (Motterlini *et al.*, 2000). Tento fakt poukazuje na významnost HO v organismech. HO zajišťují nejen degradaci hemu, ale zároveň jsou významnou součástí antioxidantního systému a mnoha signálních drah. V rostlinných systémech se podílí na syntéze fytochromů, tvorbě postranních kořenů a regulaci otevírání a zavírání průduchů (Shekhawat a Verma, 2010).



Obr. 3 Zapojení hemoxygenasy do antioxidantního systému rostlin. Produkty degradace hemu jsou rozdílně zapojeny do signálních a obranných drah. CO se uplatňuje jako signální molekula, biliverdin-IX α jako antioxidant a kation Fe²⁺ je vázán do proteinu ferritinu. Pro rostlinný ferritin se předpokládá antioxidantní působení obdobně jako u živočichů, kde bylo potvrzeno (upraveno dle Shekhawat a Verma, 2010).

Nejprve byla HO identifikována v játrech potkana (Tenhunen *et al.*, 1968). Až o mnoho let později byla provedena identifikace HO u fotosyntetických organismů. Po prvotním výzkumu HO v živočišných tkáních vedly získané informace k důkladné studii HO v celé řadě organismů. Takto byly izolovány geny kódující HO z tkání savců, pletiv vyšších rostlin, červených řas, sinic nebo kultur patogenních bakterií. Bylo zjištěno, že primárním úkolem HO je vždy katalýza degradace hemu. Rozdíl v úloze HO mezi organismy byl pozorován až ve využití produktů získaných odbouráváním hemu (Stevens a Small, 1976; Stocker *et al.*, 1987; Elich *et al.*, 1989).

U vyšších rostlin byly prozatím identifikovány 4 geny kódující izoenzymy HO - HO1, HO2, HO3 a HO4 (Shekhawat a Verma, 2010). Tyto izoenzymy lze rozdělit do dvou tříd dle rozdílnosti aminokyselinové sekvence proteinu. První třída je tvořena izoenzymy HO1, HO3 a HO4. Do druhé třídy patří pouze izoenzym HO2. Nutno zdůraznit, že izoenzymy HO3 a HO4 byly identifikovány pouze v *Arabidopsis thaliana* (Davis *et al.*, 2001; Emborg *et al.*, 2006). Studie prokázali, že nejvíce je exprimován izoenzym HO1, což znamená, že je mu věnována i největší pozornost (Matsumoto *et al.*, 2004). HO1 je lokalizována převážně ve stromatu chloroplastů (Muramoto *et al.*, 1999). Dalším místem lokalizace HO1 jsou mitochondrie. Lokalizace izoenzymů HO2, HO3 a HO4 není zcela přesně určena, ale dosavadní výsledky jsou podobné jako u HO1. Důvodem je přítomnost N-terminální sekvence ve struktuře izoenzymů HO, která určuje přesnou lokalizaci v chloroplastech a mitochondriích. Přesto ale není objasněno, zda má gen kódující HO původ v plastidovém a mitochondriálním genomu nebo genomu rostliny (Silva-Filho, 2003; Rudhe *et al.*, 2004). Transkripce HO1 genu může být up-regulována mnoha faktory, kterými mohou být ROS, UV záření nebo těžké kovy. Tento fakt poukazuje na podobnost mezi rostlinnou a živočišnou HO1 (Maines, 1988, Shekhawat a Verma, 2010). Tyto informace vedou ke studování možné podobnosti mezi rostlinnou a živočišnou HO2, jelikož k dnešnímu dni stále není známa přesná funkce HO2 v rostlinách. Živočišná i rostlinná HO2 je produkována konstitutivně a její expresi nelze indukovat tak, jako u izoenzymu HO1. Její přesnou identifikaci lze provést rentgenostrukturní krystalografií, která odhalila značnou rozdílnost mezi strukturami izoenzymů HO1 a HO2 a to i v oblasti aktivního místa izoenzymů. Významnou úlohou HO2 v živočišných tkáních je udržování homeostázy kyslíku (Adachi *et al.*, 2004). HO2 nekatalyzuje degradaci hemu, ale plní funkci proteinu vázající hem. Podílí se na udržení stabilní hladiny intracelulárního hemu.

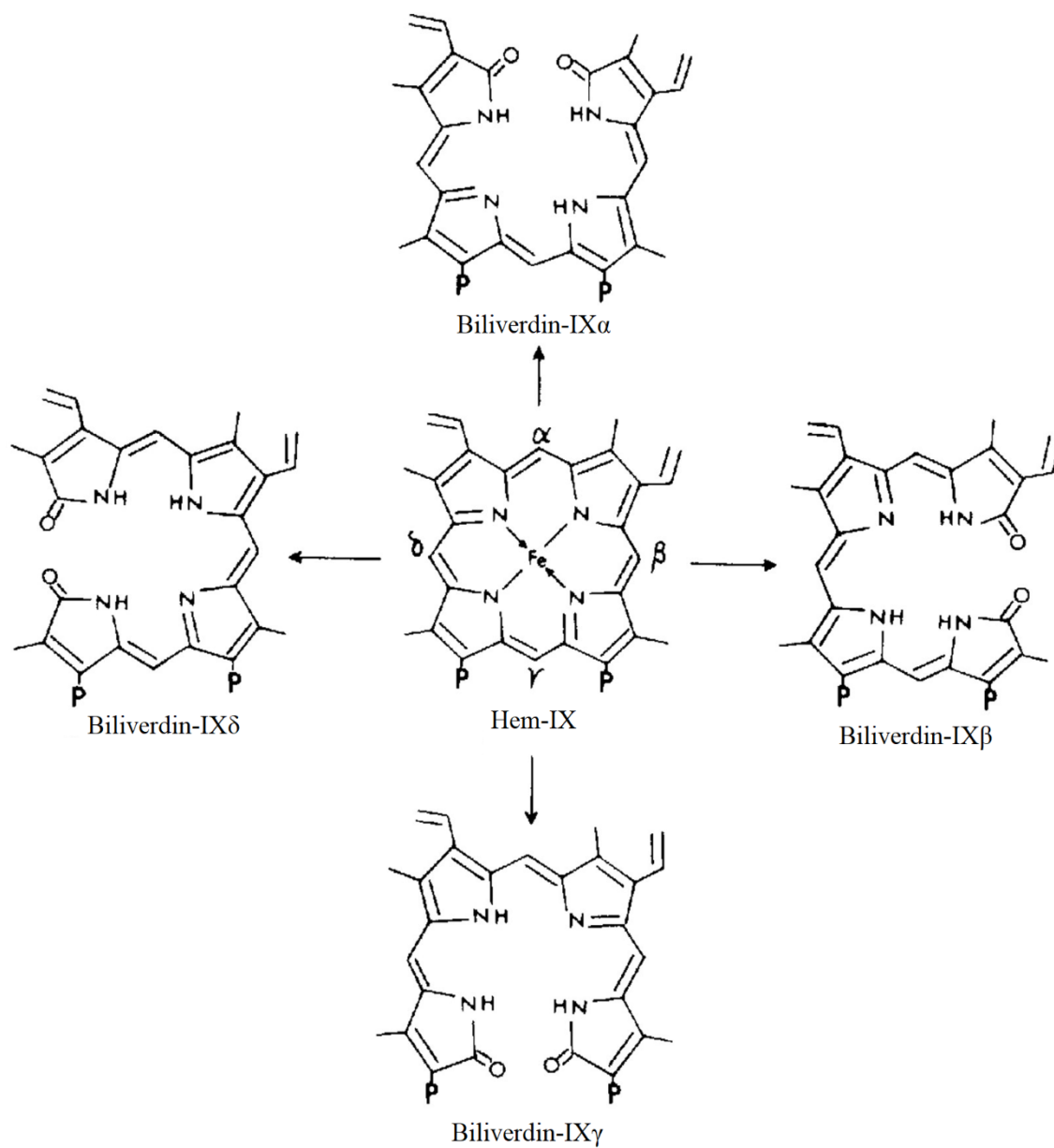
To je v souladu s udržováním stabilní koncentrace kyslíku v organismu, jelikož hem, jako prostetická skupina, hraje významnou roli v přenosu kyslíku (Adachi *et al.*, 2004). Je možné, že i rostlinná HO₂ plní obdobnou funkci.

2.2 Biliverdin v rostlinách

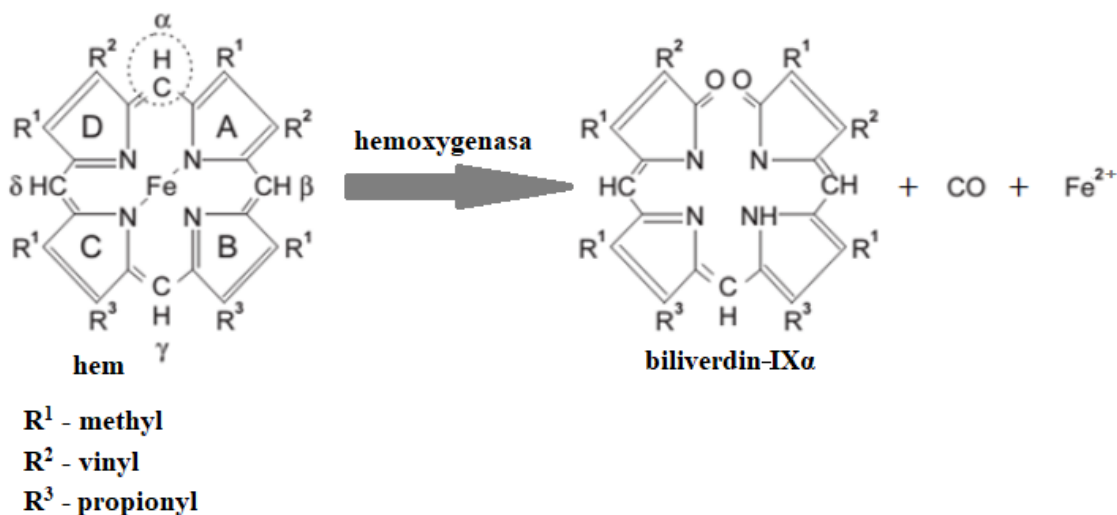
2.2.1 Biosyntéza a přeměny biliverdinu

Biliverdin (BV) je metabolit tmavě zelené barvy, který je produkovaný intracelulárně v průběhu degradace hemu. Degradací hemu za katalýzy HO vzniká jako jeden z produktů biliverdin-IX α (BV-IX α). Ten je u živočichů dále odbouráván na bilirubin-IX α (BR) za katalýzy enzymem biliverdinreduktasou (BVR; EC 1.3.1.24). K průběhu reakce je potřeba NADPH (Muramoto *et al.*, 2002; Terry *et al.*, 2002; Gohya *et al.*, 2006). Naproti tomu v rostlinných systémech nevzniká BR, jelikož v rostlinných pletivech není přítomen enzym BVR. Vzniklý BV je využit k syntéze fytochromů. První reakce syntézy fytochromů probíhá za katalýzy enzymem fytochromobilinsynthasou (P Φ B synthasa; EC 1.3.7.4) a je lokalizována v plastidech, přičemž z BV vzniká fytochromobilin, první z meziproduktů syntézy fytochromů. P Φ B synthasa je ferredoxin-dependentní BVR (Kohchi *et al.*, 2001).

Základem struktury BV je lineární tetrapyrol obsahující systém konjugovaných vazeb (Stocker *et al.*, 1987). Lineární tetrapyrol vzniká štěpením jednoho z methinových můstků ve struktuře porfyrinového kruhu hemu. Methinové můstky jsou celkem čtyři - α , β , γ a δ . Štěpením rozdílných můstků vznikají strukturní izomery BV: -IX α , -IX β , -IX γ a -IX δ (Obr. 4). Během degradace hemu katalyzované HO dochází pouze ke štěpení α -methinového můstku, což znamená, že vzniká pouze jeden ze zmíněných izomerů a to BV-IX α (Obr. 5) (Yamaguchi a Nakajima, 1995).



Obr. 4 Izomery biliverdinu vzniklé štěpením odlišných methinových můstků ve struktuře hemu. P = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (upraveno dle Cunningham *et al.*, 2000).

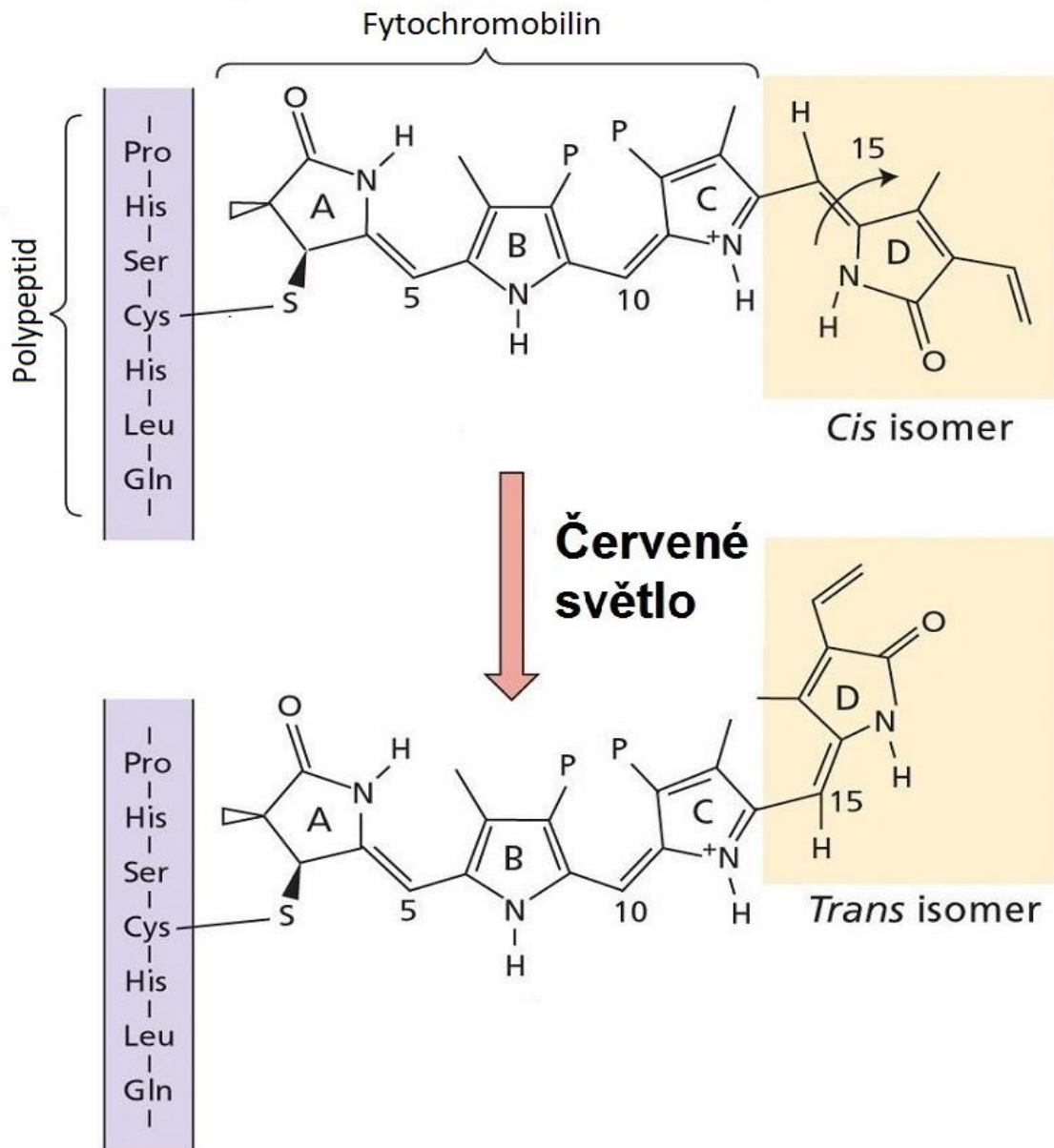


Obr. 5 Katabolismus hemu za přítomnosti hemoxygenasy. V průběhu reakce dochází ke štěpení α -methinového můstku ve struktuře hemu, což vede ke vzniku biliverdinu-IX α (upraveno dle Vítek *et al.*, 2003).

2.2.2 Syntéza fytochromů

V rostlinných systémech je BV využíván jako prekurzor pro biosyntézu fytochromů. Fytochromy jsou součástí fotosyntetického aparátu rostlin, který je potřebný pro růst a vývoj rostliny. Systém fytochromů reaguje na světelné podmínky okolního prostředí a jeho změny. Fytochromy absorbují červenou složku světelného spektra (R, 660 nm) a dlouhovlnné červené světlo (FR, 730 nm) (Quail *et al.*, 1995; Furuya a Schäfer, 1996; Neff *et al.*, 2000). Fytochromy jsou homodimerní chromoproteiny, jejichž monomer má velikost přibližně 120 kDa. Každá z podjednotek má kovalentně navázanou prostetickou skupinu, kterou je lineární tetrapyrrolový chromofor fytochromobilin (P Φ B). Kovalentní vazba mezi proteinem a P Φ B je zprostředkována thioetherovou vazbou. Takto sestavený fytochrom se vyskytuje ve formě jednoho ze dvou stabilních konformerů (Obr. 6). První je forma Pr, která absorbuje červené světlo, druhou formou je Pfr absorbující dlouhovlnné červené světlo. Fytochromy jsou syntetizovány jako Pr forma, která je biologicky neaktivní. K aktivaci dochází ozáření červeným světlem, což vede k fotokonverzi na Pfr formu, která je biologicky aktivní. Pfr forma může přejít zpět na Pr formu po ozáření dlouhovlnným červeným světlem, tento jev se označuje jako fotoreverze. Působení fytochromů je závislé na schopnosti přechodu mezi Pr a Pfr formou v důsledku absorpce složek světelného záření. Schopnost fotokonverze a fotoreverze fytochromů je uložena

v molekule P Φ B. Pr forma obsahuje lineární tetrapyrol v konformaci cis-cis-cis, zatímco Pfr forma má konformaci cis-cis-trans. Rostliny využívají přepínání mezi Pr/Pfr formou a jejich poměr k hodnocení intenzity, směru, trvání a spektrálního složení světelného prostředí. Tímto způsobem rostliny hodnotí i konkurenci na stanovišti a to tak, že při průchodu světelného záření listy jiných rostlin se poměr mezi červenou složkou světelného spektra a dlouhovlnným červeným světlem mění, což se projeví v poměru mezi Pr a Pfr formou. Při přenosu získaných informací dochází k signalizaci, kde se uplatňuje biologická aktivita Pfr formy, která je schopna autofosforylace a má kinázovou aktivitu, která vyvolá fosforylační kaskádu, čímž je signál převeden až na úroveň genové exprese, která je tímto způsobem přizpůsobena potřebám růstu a vývoje. Odpovědi na tento signál vedou ke kontrole životního cyklu, rozvoji chloroplastů, klíčivosti semen, vývoji stonků a listů (Lagarias a Rapoport, 1980; Smith, 1995; Quail, 2002; Wikipedia).

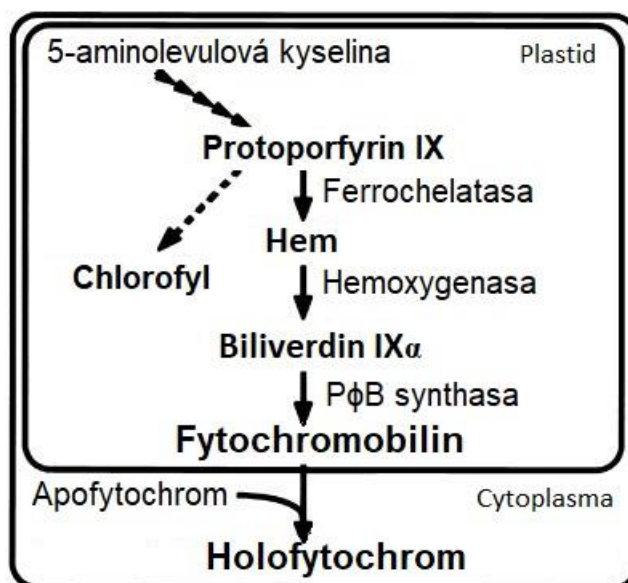


Obr. 6 Struktura fytochromu. *Cis* izomer je biologicky neaktivní Pr forma absorbující červené světlo. Absorbací dochází ke strukturální změně a vzniká *trans* izomer, což je biologicky aktivní Pfr forma. *Trans* izomer může být převeden zpět na *cis* izomer absorpcí dalekého červeného světla (upraveno dle Andel *et al.*, 1997).

Na syntéze fytochromu se podílejí dvě metabolické dráhy (Obr. 7). První dráhou je dráha pro syntézu apoproteinu, který je kódován malou multigenovou rodinou. Počet genů v genové rodině kódující apoprotein je v rámci rostlinných druhů různý, například v *A. thaliana* bylo detekováno pět genů. Apoprotein, nebo-li apofytochrom je

syntetizován v cytosolu (Quail *et al.*, 1995; Quail, 2002). Druhá dráha vede k syntéze P Φ B z ALA a probíhá pouze v plastidech. Vzniklý P Φ B je z plastidů uvolněn do cytosolu, kde se spojí s apofytochromem za vzniku holofytochromu. Reakce je katalyzována bilinyasou, která se váže na apofytochrom poté, co je P Φ B transportován do cytoplasmy (Terry *et al.*, 2002).

ALA je výchozí molekulou nejen pro syntézu P Φ B, ale i chlorofylu a hemu. Klíčovým bodem syntetické dráhy z ALA je vznik cyklické struktury protoporfyrinu IX. V tomto bodě je vzniklý protoporfyrin IX buď nasměrován k produkci chlorofylu za katalýzy enzymem Mg²⁺chelatasou (MgCH; EC 6.6.1.1) nebo je syntetizován hem za katalýzy enzymem ferrochelatasou (FECH, EC 4.99.1.1) (Papenbrock a Grimm, 2001). Dráha syntézy P Φ B vede přes degradaci molekuly hemu. Tento krok je katalyzován HO a vzniká BV-IX α . V rostlinách je pro průběh této reakce potřebný kyslík a ferredoxin, který působí jako donor elektronů (Muramoto *et al.*, 2002). Vzniklý BV-IX α je dále enzymaticky redukován P Φ B synthasou za vzniku 3Z-P Φ B. Aktivita P Φ B synthasy je závislá na ferredoxinu. 3Z-P Φ B je izomerizován na 3E-P Φ B. Zda je tato přeměna enzymová nebo probíhá spontánně, není doposud známo. Jeden nebo oba izomery P Φ B jsou transportovány do cytosolu, kde je sestaven funkční fytochrom (Emborg *et al.*, 2006).



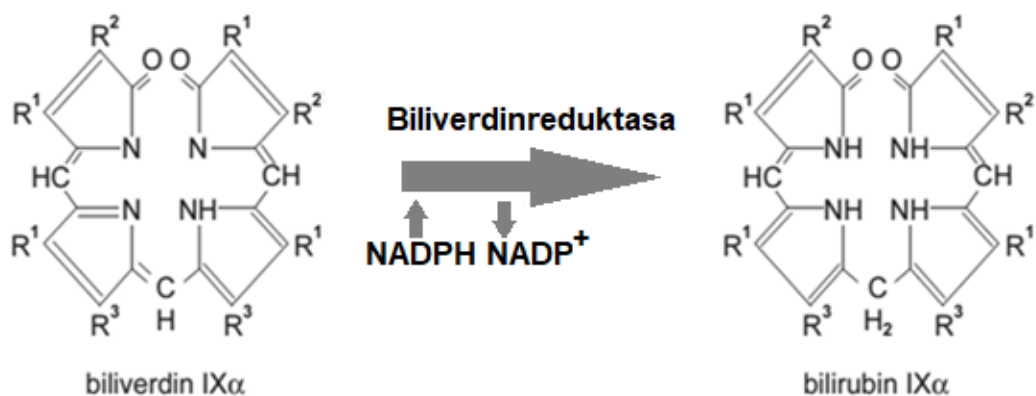
Obr. 7 Biosyntéza fytochromu. V plastidech je lokalizována syntéza fytochromobilinu z kyseliny 5-aminolevulové, která je zároveň prekurzorem chlorofylu. V cytoplazmě je následně sestaven holofytochrom z proteinové struktury apofytochromu a z plastidu transportovaného fytochromobilinu (upraveno dle Kohchi *et al.*, 2001).

2.2.3 Úloha biliverdinu ve stresových podmínkách

2.2.3.1 Biliverdin v živočišných tkáních

Úloha BV v organismu byla doposud důkladně zkoumána hlavně u živočichů. Výzkum zaměřený na tkáně nižších živočichů - ptáků, plazů a obojživelníků, se zabývá pouze BV (Marilena, 1997). BV vzniklý v tkáních nižších živočichů je buď přímo vylučován jako odpadní produkt nebo je využíván k pigmentaci např. skořápek vajec. Naproti tomu výzkum v savčích tkáních tkání je zaměřen na dvojici metabolitů hemu BV a BR. Enzymatická přeměna BV na BR je katalyzována enzymem BVR (Obr. 8) a je evoluční záležitostí. Ta má původ ve fyzikálně-chemických vlastnostech obou metabolitů, konkrétně v hydrofobicitě, kdy BR je hydrofóbnější než BV. Předpokládá se, že vývoj placenty je důvodem nutnosti přeměny BV na BR, jelikož méně hydrofobní BV by přes placentu nepřešel a docházelo by k jeho akumulaci v těle plodu. Význam tedy spočívá ve snížení rizika cytotoxicity vyšších koncentrací BV pro plod (Pascolo *et al.*, 2001). Dalším důvodem evolučního tlaku ve prospěch BR je fakt, že hydrofóbnější BR se lépe

váže na lipidy, čímž je zajištěna lepší ochrana membrán před oxidací a peroxidací (Stocker *et al.*, 1987; Sedlak a Snyder, 2004).



Obr. 8 Redukce biliverdinu IX α na bilirubin IX α . Reakce je katalyzována enzymem biliverdinreduktasou. Průběh reakce vyžaduje přítomnost NADPH jako redukčního kofaktoru (upraveno dle Víték *et al.*, 2003).

Enzymová redukce BV na BR je rychlá a kvantitativní. Vzniklý BR je považován za nejúčinnější antioxidant savčích tkání. Předpokládá se redoxní cyklická dráha působení, kdy BR je využit jako redukční činidlo, ke stabilizaci reaktivních forem kyslíku a dusíku (ROS, RNS), přičemž je sám oxidován na BV. Vzniklý BV může být opět enzymaticky redukován na BR nebo využit jako antioxidant intracelulárního prostoru. Tento navržený antioxidační redoxní cyklus je v současné době stále diskutován. Jsou prováděny studie za účelem potvrzení výskytu a významu cyklu. V poslední době nové studie argumentují proti redoxnímu cyklu zprostředkovanému BVR, přestože z počátku byly předkládány chemické důkazy o jeho výskytu (Maghzal *et al.*, 2009; McDonagh, 2010; Jansen a Daiber, 2012; Gonzalez-Sanchez *et al.*, 2016). Studie zabývající se existencí antioxidačního redoxního cyklu vedly k zisku mnoha poznatků o významnosti a působením nejen BR, ale i BV. Získané informace jsou důležité pro potvrzení významu BV jako ochranné molekuly živočišných tkání. Obecně popsané ochranné vlastnosti BV v živočišných tkáních jsou nejen antioxidační, ale i protizánětlivé, antiapoptické, antiproliferativní a imunomodulační. Veškerá ochrana spočívá v antioxidačních vlastnostech BV. Postižená tkáň je chráněna tak, že BV se spotřebovává při snižování koncentrací ROS a RNS, které mají během těchto procesů důležitou signální funkci (Baranano *et al.*, 2002; Florczyk *et al.*, 2011; Jansen a Daiber, 2012; Gonzalez-Sanchez *et al.*, 2016).

2.2.3.2 Biliverdin v rostlinných pletivech

BV vzniklému v rostlinách degradací hemu za katalýzy HO je připisován velký význam. Nejen že je výchozí molekulou pro syntézu fytochromů, ale na základě poznatků zaměřených na studium BV v živočišných tkání jsou předpokládány antioxidační vlastnosti a s nimi související antiapoptické a antiproliferativní vlastnosti BV i v rostlinných modelech. Za účelem potvrzení těchto předpokladů jsou prováděny studie. Ty se primárně nezabývají BV, ale enzymem HO. Balastrasse *et al.* (2005; 2008) se zaměřil na vliv těžkých kovů (kadmia) na rostlinky sóji. Publikované výsledky dokazují, že vlivem aplikace kadmia došlo ke zvýšení koncentrace biliverdinu v důsledku zvýšené aktivity izoenzymu HO1, která je významnou součástí antioxidačního systému rostlin. Studie se dále zaměřují na společnou exogenní aplikaci kadmia a biliverdinu, jejichž výsledkem je sledování poklesu množství ROS. Tyto studie potvrzují antioxidační úlohu

HO a jsou prvotní informací potvrzující vliv biliverdinu na snížení oxidačního stresu vyvolaného těžkými kovy (Balestrasse *et al.*, 2005; 2008).

2.2.3.3 Biliverdin a stres

Dlouhou dobu byly BV, společně s BR považovány pouze za odpadní produkty degradace hemu, kterým nebyly přisuzovány žádné další významné role. I přesto, že se opravdu jedná o metabolické odpadní produkty, které mají ve větším množství škodlivé účinky a za normálních fyziologických podmínek jsou rychle eliminovány, nelze tyto metabolity považovat za bezvýznamné (Roy-Chowdhury, 1996). V roce 1976 bylo poprvé pozorováno, že BR v organickém rozpouštědle zhasí kyslíkové radikály, což vedlo k mnoha dalším experimentům (Stevens a Small, 1976). Bylo zjištěno, že BV a BR jsou silnými antioxidanty. Mají nezastupitelnou roli v ochraně buněčných struktur, obzvláště membrán, jelikož zabraňují oxidaci a peroxidaci lipidů. Antioxidační vlastnosti molekul BV a BR mají původ v jejich struktuře (Stocker *et al.*, 1987). Mechanismus jejich působení je takový, že BV interaguje s radikály (ROS, RNS) za vzniku stabilních produktů, BR je naopak donorem elektronů, potřebných ke stabilizaci radikálů. Tvorba stabilních produktů po interakci s radikály a stabilizace radikálů vede ke snižování vyšších koncentrací radikálů v živých organismech, což vede ke snížení toxicity radikálů na živý organismus (Stocker *et al.*, 1987; Neužil a Stocker, 1993).

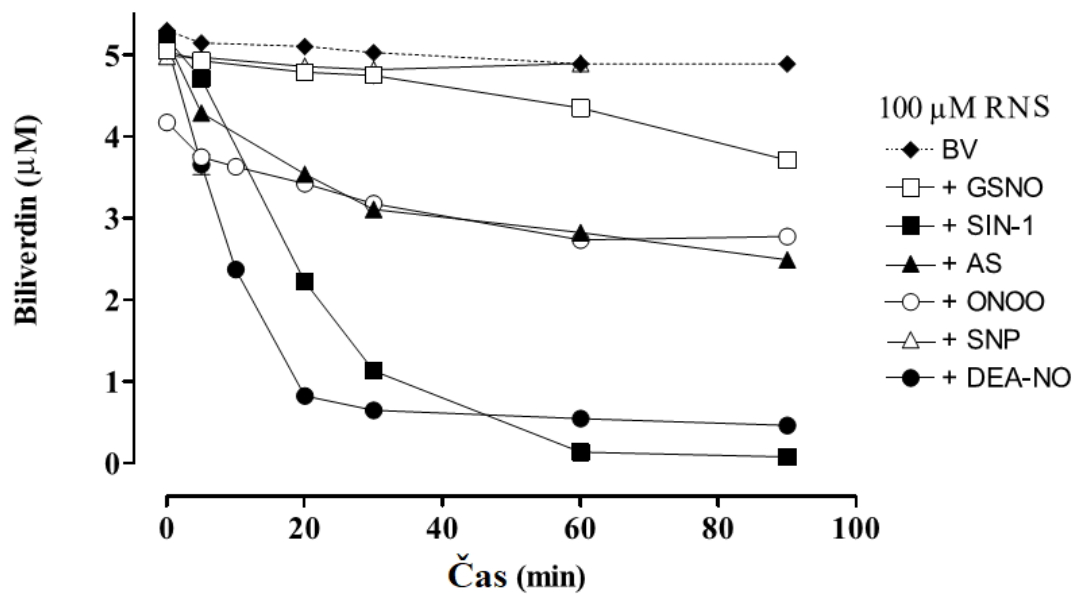
Během vývoje jsou jak živočichové, tak rostliny vystaveny biotickému a abiotickému stresu. Stres způsobuje nadměrnou tvorbu ROS a RNS. Jako ROS a RNS jsou označovány sloučeniny odvozené od kyslíku nebo dusíku obsahující ve své struktuře nespárovaný elektron, případně látky, které jsou zdrojem radikálu. Jedná se o molekuly, které se v organismu přirozeně vyskytují ve velmi nízkých koncentracích a významně se uplatňují při signalizaci na molekulární úrovni (Kaur *et al.*, 2003; Jansen a Daiber, 2012). Pokud ale působí na organismus některý ze stresových faktorů, dochází mimo jiné ke zvýšené produkci ROS a RNS, která je škodlivá. Vysoké koncentrace jsou toxické a mohou způsobit buněčnou smrt. ROS a RNS jsou reaktivní molekuly narušující buněčné struktury. Vyšší koncentrace ROS způsobují oxidaci a peroxidaci struktur. Vznikají během aerobního metabolismu v různých strukturách buňky. Patří mezi ně singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), superoxidový anionradikál (O_2^-), hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), perhydroxylový radikál ($\text{O}_2\text{H}\cdot$) a peroxid vodíku (H_2O_2) (Neužil a Stocker, 1993).

RNS zahrnují oxid dusnatý (NO) a jeho energeticky výhodnější struktury nitrosoniový kation (NO^+) a nitroxylový radikál (NO^\cdot). RNS interagují se strukturami v cílových místech, kterými jsou thiolové skupiny a ionty přechodných kovů. (Durner *et al.*, 1998). ROS společně s RNS se mohou přeměňovat na jiné, reaktivnější formy. Příkladem je peroxynitritový anion (ONOO^-) vzniklý reakcí NO s O_2^- (Lipton *et al.*, 1993; Yamasaki *et al.*, 1999). Mechanismus působení ROS a RNS je založen na jejich vysoké reaktivitě. Jsou schopné reagovat se složkami buněčných struktur, kterými jsou lipidy, proteiny, DNA, RNA, enzymové komplexy a další molekuly. Reakce mezi reaktivní formou a buněčnou strukturou vede k funkčním a strukturním změnám, které mohou vést až k dysfunkci buněčných složek. V případě DNA může reakcí dojít k pozměnění informace v ní uložené, což může mít pro buňku katastrofální následky (Neužil a Stocker, 1993; Hughes, 1999). Proto mají živočichové a rostliny vyvinuté obranné mechanismy, které nadbytečné ROS a RNS efektivně odbourávají. Na ochraně buňky se podílí široké spektrum nízkomolekulárních látek a enzymových systémů. Enzymy se podílí na obraně dvojnásobným způsobem, buď katalyzují reakci degradace/stabilizace reaktivní formy nebo katalyzují reakci, při které vznikají molekuly s antioxidačními účinky. Právě produkce antioxidační molekuly je charakteristická pro enzym HO (Balestrasse *et al.*, 2005; Sharma a Dietz, 2008; Verma *et al.*, 2008; Shekhawat a Verma, 2010). Bylo zjištěno, že zvýšené koncentrace ROS a RNS výrazně ovlivňují buněčnou expresi HO v tkáních. Obecně platí, že oxidační stres vede ke zvýšené regulaci aktivity enzymu HO, konkrétně izoformy HO1, jejíž aktivita je indukována za stresových podmínek a slouží k ochraně tkání (Otterbein a Choi, 2000; Otterbein *et al.*, 2000).

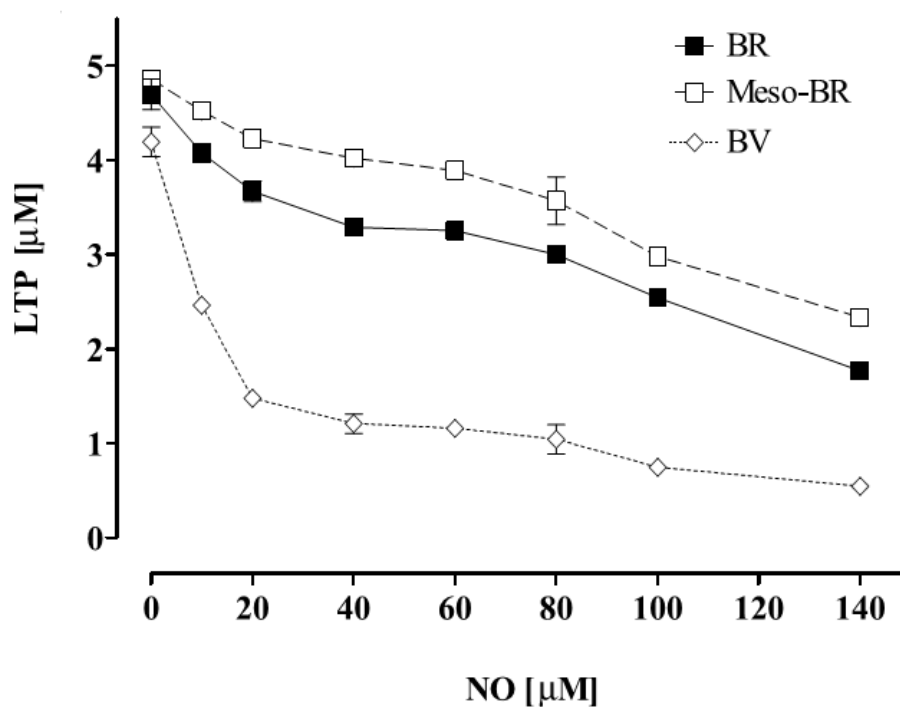
2.2.4 Interakce biliverdinu s ROS a RNS

Byla provedena řada studií zabývajících se interakcí BV a BR s ROS a RNS. Jelikož se v rostlinných pletivech vyskytuje pouze BV, budou interpretovány získané informace pro tuto molekulu. Způsob provedení sledování interakcí spočívá v aplikaci zdroje ROS nebo RNS do média obsahujícího BV získaný z tkáňové kultury nebo do roztoku o známé koncentraci standardu BV. Po aplikaci následuje sledování změn a intenzity absorpčních spekter, pomocí kterých se hodnotí průběh interakce. Zároveň se studie věnují určení míst ve struktuře BV, kde reakce s reaktivními formami probíhá a objasnění struktur reakčních produktů. Zdroje RNS lze rozdělit do skupin dle molekul, které uvolňují a jejich reaktivnosti. První skupinu tvoří donory NO^+ , mající vyšší afinitu ke thiolovým

skupinám, než k atomům dusíku. Mezi tyto donory patří např. nitroprusid sodný (SNP). Druhou skupinu tvoří donory 3-morpholinosydnomin (SIN-1) a ONOO⁻, které uvolňují současně NO a O₂⁻. Do třetí skupiny patří donor Angeliho sůl (AS), uvolňující NO⁻. Čtvrtou skupinu tvoří zdroje NO, mezi které patří diethylamino-NONOát (DEA-NO). Pátá skupina látek je donorem jak NO, tak i NO⁺. Příkladem takové látky je S-nitrosoglutathion (GSNO). Kaur *et al.* (2003) uvádějí, že přidavek těchto látek vedl k poklesu koncentrace BV v čase (Obr. 9). Výjimkou je pouze donor SNP, jehož přidavek k BV nevyvolává žádnou reakci. Reaktivita donorů RNS je limitována pouze jejich stabilitou. Vliv přítomnosti kyslíku na reakci RNS s BV byl vyloučen provedením experimentu za anaerobních podmínek. Výsledky experimentů za aerobních a anaerobních podmínek jsou srovnatelné, s BV reagovaly všechny donory RNS mimo SNP. Obdobné výsledky byly získány měřením s BR. To poukazuje na podobnou antioxidační úlohu BV a BR, mající původ ve struktuře molekul. Zajímavým výsledkem těchto studií je fakt, že BV je oproti BR citlivější na nižší koncentrace NO. To by mohlo vést k dalším studiím, zabývajícím se citlivostí obou antioxidantů na reaktivní formy. Zároveň byly provedeny experimenty zaměřující se na původ antioxidačních vlastností ve struktuře BV a BR (Obr. 10). Pro provedení experimentu byl vybrán meso-BR, mající stejnou strukturu jako BR, ale s nasycenými postranními vinylovými řetězci. Jelikož došlo k poklesu koncentrace meso-BR v čase v důsledku reakce meso-BR s NO, lze usoudit, že antioxidační vlastnosti jsou uloženy ve struktuře lineárních tetrapyrólů a postranní řetězce se na nich nepodílí (Kaur *et al.*, 2003).



Obr. 9 Pokles koncentrace BV v závislosti na čase při reakci s RNS. BV reaguje se všemi donory RNS mimo SNP. Donory AS a ONOO⁻ podléhají rychlému rozkladu, což znemožňuje pozorování reakce v delším časovém intervalu. Reakce BV s GSNO je pouze částečná, zatímco přídavek DEA-NO a SIN-1 způsobil po 90 minutách úplnou reakci BV (převzato z Kaur *et al.*, 2003).



Obr. 10 Pokles koncentrací lineárních tetrapyrrolů (LTP) v závislosti na zvyšující se koncentraci NO. BV reaguje s nižšími koncentracemi NO ve srovnání s BR. Meso-BR reaguje s NO taktéž, což podporuje hypotézu o původu antioxidantních vlastností ve struktuře lineárních tetrapyrrolů (převzato z Kaur *et al.*, 2003).

Interakce BV s ROS prozatím nebyly provedeny. Do dnešní doby se studie zaměřují pouze na reaktivitu BR s ROS. Tyto studie prokázali ochrannou úlohu BR vůči ROS (Stocker *et al.*, 1987; Neuzil a Stocker, 1993). Na základě podobnosti získaných dat z měření interakcí BV a BR s RNS se předpokládá, že i reaktivita BR a BV s ROS bude obdobná.

Na základě těchto informací se v rostlinných modelech předpokládá obdobné působení BV jako ochranné molekuly. Do dnešní doby nebyly provedeny práce zabývající se přímo antioxidantní úlohou BV v rostlinách. Veškeré domněnky o jeho antioxidantní úloze v rostlinných systémech jsou především závislé na studiích provedených se standardy nebo vzorky získanými z živočišných tkání a sér. Problémem mnoha studií je jejich provedení se savčími vzorky. Ty obsahují velké množství BVR, která přeměňuje skoro všechny BV na BR, tudíž je koncentrace volného BV velmi nízká a je znemožněno

objektivní studium BV jako antioxidantu v savčích tkáních (Stocker *et al.*, 1987; Sedlak a Snyder, 2004, Martelanc *et al.*, 2016).

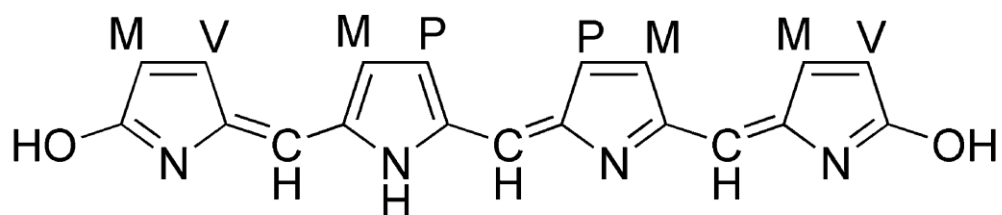
2.3 Přehled metodiky

Metodám analýzy BV je věnována větší pozornost až v posledních letech, kdy byly prokázány ochranné vlastnosti BV. Většina metod se zaměřuje na společné stanovení volného BV a BR ve vzorcích z lidských sér. Důvodem k vyvinutí společné analýzy bylo zjištění, že poměr BR/BV může sloužit jako biomarker některých chorob, u kterých dochází k oxidačnímu poškození tkání. Příkladem je Parkinsonova choroba, kdy nemocní jedinci mají vyšší hodnoty BV a celkový poměr BR/BV je tak snížen (McDonagh, 2010; Martelanc *et al.*, 2016). Obě žlučová barviva se v biologických vzorcích vyskytují ve stopových množstvích z důvodu účinné kontroly obou struktur kvůli cytotoxicitě. Vyvinuté analytické metody musí být selektivní a citlivé (Martelanc *et al.*, 2016). Metody sloužící k analýze BV v rostlinných vzorcích nebyly prozatím vyvinuty. Pro rostlinné vzorky se předpokládá aplikace metod vyvinutých pro živočišné vzorky.

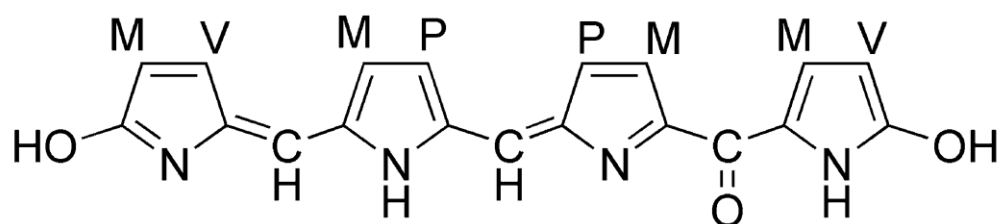
2.3.1 Stabilita a extrakce biliverdinu

BV je polární molekula, z toho důvodu je nutné standardy BV a vzorky obsahující BV pro analýzy rozpouštět, případně ředit polárními organickými rozpouštědly (Martelanc *et al.*, 2016). Vhodnými polárními organickými rozpouštědly pro BV jsou chloroform, methanol a DMSO (Gray *et al.*, 1972; Kaur *et al.*, 2003; Martelanc *et al.*, 2016). Z praktického hlediska a velkého využití HPLC analýz je nejpoužívanější methanol. Jiná organická rozpouštědla způsobují leptání kapilár a poškození kolony HPLC analyzátoru.

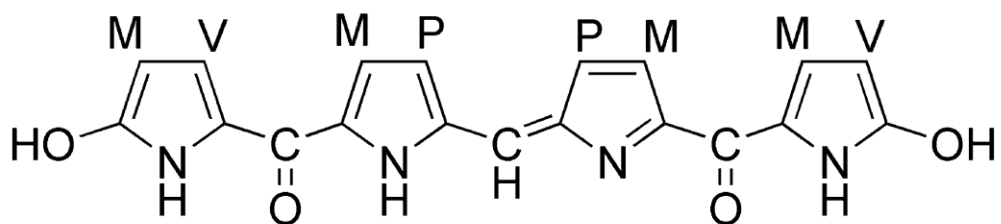
Molekula BV je obecně nestabilní a velmi snadno podléhá oxidaci a fotooxidaci v oblasti β - a δ -methinových můstků. Oxidací jednoho z můstků vzniká struktura nazývaná purpurin, oxidací obou můstků choletelin (Obr. 11) (Gray *et al.*, 1972; Silvestrini *et al.*, 2014). Důvodem náchylnosti BV k oxidaci je přítomnost „reaktivních atomů vodíku“, které jsou navázány na atomy dusíku pyrolů (-NH skupina). BV má ve své struktuře tři takové to „reaktivní atomy vodíku“. Tyto vodíky mohou být snadno přeneseny na radikál za vzniku pyrolového radikálu. Ten je následně stabilizován delokalizací elektronů a reakcí s dalšími radikály (Chepelev *et al.*, 2006; MacLean *et al.*, 2008).



Biliverdin



Purpurin



Choletelin

M -CH₃

V -CH=CH₂

P -CH₂-CH₂-COOH

Obr. 11 Oxidační produkty biliverdinu. Purpurin vzniká oxidací na jednom methinového můstku a choletelin oxidací na dvou methinových můstcích (upraveno dle Silvestrini *et al.*, 2014).

Přítomnost oxidačních produktů v původním vzorku BV lze snadno detekovat změřením absorpčního spektra. BV má absorpční maxima při 380 a 650 nm, v oblasti kolem 500 nm se nachází absorpční minimum. Přítomnost oxidačních produktů posunuje absorpční maxima v absorpčním spektru směrem doleva. Přeměna BV na purpurin se projeví posunem absorpčních maxim na 350 a 550 - 650 nm, absorpční minimum se vyskytuje kolem 450 nm. Výskyt choletelinu se projeví posunem absorpčních maxim na 315 a 490 - 510 nm, absorpční minimum se vyskytuje kolem 415 nm (Gray *et al.*, 1972).

Kvůli nízké stabilitě BV a možnosti degradace BV na oxidační produkty je nutno vzorky BV chránit před přístupem světla, které způsobuje jeho fotooxidaci. Zároveň je nutné i co nejvíce omezit přístup kyslíku, aby byla zajištěna co nejdelší stabilita vzorků BV.

2.3.2 Spektrální metody kvantifikace biliverdinu

Spektrální metody kvantifikace BV jsou založené buď na jeho enzymové přeměně na BR nebo jeho oxidaci na purpurin. Důvodem je nestabilita BV a jeho snadná fotooxidace. Proto je BV převáděn na struktury s vyšší stabilitou, které jsou spektrálními metodami detekovány.

Studie zaměřená na prekurzory bilinových pigmentů vyvinula fluorimetrickou metodu k jejich stanovení (Gardikas *et al.*, 1950). Princip této metody je založen na degradaci hemoglobinu za vzniku BV. Vzniklý BV je v prostředí acetátu zinečnatého oxidován oxidačním činidlem, kterým je jód v roztoku jodidu draselného. Za těchto podmínek se tvoří fluoreskující zinečnatá sůl purpurinu, který je prvním oxidačním produktem BV. Získaný fluorescenční signál je natolik silný, že je nutné reakční směs zředit methanolem a až poté je možné měřit fluorescenční signál. Pro správné provedení metody je nutné zamezit přístupu vody do reakční směsi, což by mělo za následek snížení fluorescenčního signálu. Dále je nutné dodržovat přesný rozsah koncentrací octanu zinečnatého a jódu, aby nedocházelo k oxidaci vznikajícího purpurinu až na choletelin (Gardikas *et al.*, 1950).

Metody stanovení aktivity HO využívají jako druhý reakční krok kvantitativní přeměnu BV na BR, která je katalyzována izolovanou BVR. Vzniklý BR byl dříve z reakční směsi extrahován do chloroformu a poté se měřila absorbance chloroformové fáze (McNally *et al.*, 2004). Důvodem nutnosti extrakce BR do chloroformu je překryv absorpčního spektra BR a absorpčního spektra heminu, který má v reakční směsi význam

jako substrát pro enzym HO. Navíc vzniklý BR v reakční směsi nelze měřit fluorimetricky, jelikož signál BR je zkreslen jinými složkami reakční směsi. Tyto poznatky vedly k vývoji metody, která využívá tvorby komplexu BR/albumin (Klemz *et al.*, 2009). Na základě tvorby komplexu BR/albumin se zvyšuje rozpustnost BR ve vodných roztocích, čímž se podstatně zvyšuje fluorescenční signál BR a fluorescence reakční směsi je zanedbatelná. To umožňuje spolehlivé měření vzniklého BR (Klemz *et al.*, 2009).

Nevýhodou spektrálních metod kvantifikace je jejich limit detekce, který řádově odpovídá mM a μ M koncentracím BV ve vzorku. Aplikace těchto metod je vhodná na vzorky s vysokým obsahem BV. Pro stanovení endogenního BV v živočišných a rostlinných vzorcích tyto metody nejsou vhodné, jelikož endogenní koncentrace BV v těchto vzorcích jsou nižší, než je limit detekce těchto metod.

2.3.3 Metody kvantitativní analýzy biliverdinu

Biologickým vzorkem často bývá směs látek o různé polaritě. Pro analýzu volného BV ve vzorku se využívá metody HPLC na reverzní fázi využívající k detekci detektor diodového pole (DAD) nebo spektroskopii tepelnou čočkou (TLS). Provedení HPLC na reverzní fázi (RP), tedy za použití nepolárního adsorbentu, se využívá pro separaci látek s různou polaritou. Stacionární fáze je vázána na nosič, kterým bývá silikagel modifikovaný nepolárními skupinami. Čím více je molekula polární, tím méně se stacionární fází interaguje. Zatímco molekuly s méně polárním charakterem interagují více a jsou zadržovány. Samotná interakce mezi molekulami vzorku a stacionární fází má původ v hydrofobních interakcích. Z těchto faktů lze odvodit, že nejdříve budou eluovány vysoce polární látky, které budou se stacionární fází interagovat minimálně. Eluce dalších molekul vzorku bude závislá na jejich klesající polaritě. Jako mobilní fáze pro RP-HPLC je hojně využívána směs vody nebo vodného roztoku o daném pH a polárního organického rozpouštědla (methanol, acetonitril). Eluce se provádí isokraticky nebo gradientově. Při isokratické eluci se složení mobilní fáze během separace nemění, zatímco při gradientové ano.

Pro analýzu volného BV se jako stacionární fáze osvědčila kolona typu C18 obsahující oktadecylové uhlíkové řetězce a jako mobilní fáze roztok octanu amonného (Martelanc *et al.*, 2016). Důvodem, proč se využívá roztok octanu amonného je přítomnost dvou

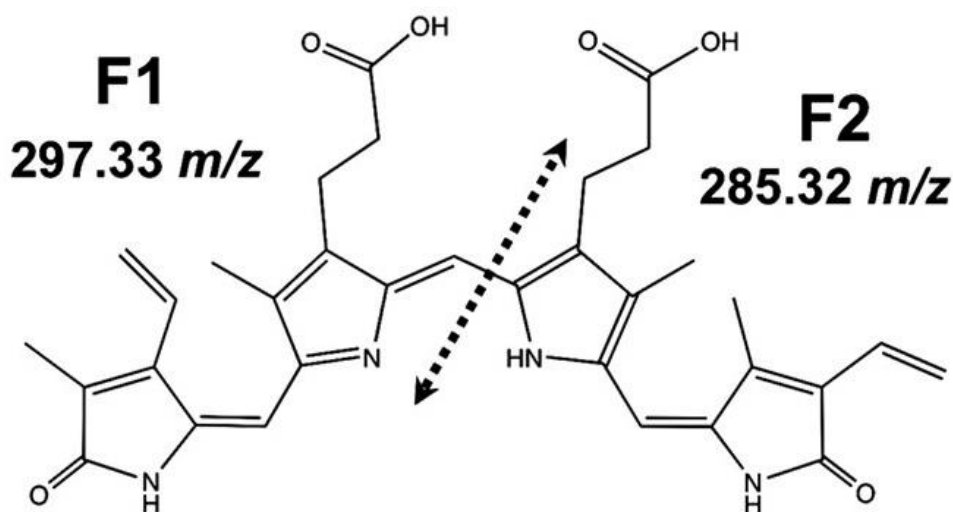
karboxylových skupin ve struktuře BV. Právě octan amonný zajišťuje pH mobilní fáze takové, že obě skupiny by již měly být disociované. Hodnoty pK_A BV jsou 3,9 a 5,3 (Lightner *et al.*, 1996). Disociace karboxylových skupin BV výrazně ovlivňuje jeho rozpustnost. Proto bývá pro lepší rozpustnost BV využíváno organického rozpouštědla s přidavkem alkálií (NH_3 , NH_4OH). Roztok octanu amonného je míchán s organickými rozpouštědly v různých poměrech v závislosti na typu eluce.

On-line detekce eluovaných molekul může být provedena pomocí DAD detektoru nebo vysoce citlivým detektorem TLS. Pomocí DAD jsou monitorovány současně vlnové délky spektra v obvyklém rozsahu vlnových délek 190 - 800 nm, což poskytuje rychlou a jednoduchou analýzu. TLS detektor využívá tepelnou čočku v kombinaci se spektrofotometrií. Signál TLS detekce je závislý na termo-optických vlastnostech prostředí, přesněji na teplotním koeficientu indexu lomu a součiniteli tepelné vodivosti. Tato závislost činí TLS techniku detekce citlivější oproti jiným konvenčním technikám a pomocí ní bylo možné poprvé detekovat volný BV v lidském séru. Pro tuto detekční metodu je ale důležité vždy nejprve experimentálně zjistit tolerovaný obsah vody v mobilní fázi, jinak dojde ke snížení signálu, což je nežádoucí. To činí TLS detekci náročnou (Martelanc *et al.*, 2016).

Přesnou a citlivou detekci BV umožňuje spojení separace kapalinové chromatografie (LC) a detekce hmotnostní spektrometrií (MS). Princip LC-MS a LC-MS/MS metod je takový, separované molekuly vzorku po průchodu chromatografickou kolonou vstupují do iontového zdroje, kde jsou ionizovány elektrosprejem, který zajišťuje převod nabitých molekul z kapalně do plynné fáze. Pro ionizaci BV je vybírán pozitivní mód, což znamená, že se na molekulu BV naváže H^+ . Molekulová hmotnost BV se z původních 582,2 zvýší na 583,3. Ionty vstupují do MS analyzátoru, kde jsou děleny dle poměru hmotnost/náboj (m/z) a detekovány v MS detektoru. V hmotnostní spektru je pak vyhledáváno m/z 583,3, které odpovídá jednonásobně nabitému iontu molekuly BV (Evans *et al.*, 2009). V případě MS/MS detekce za použití trojitého kvadrupólu jsou v prvním MS analyzátoru vybrány ionty o zvoleném m/z , v případě BV tedy o m/z 583,3. Po selekci iontů následuje jejich fragmentace v kolizní cele. Získané fragmenty jsou analyzovány ve druhém MS analyzátoru s následnou detekcí. Je detekováno fragmentační spektrum vybraného iontu. Pro identifikaci izomeru BV-IX α se detekují

fragmenty o m/z 297,3 (Nytofte *et al.*, 2011), které vznikají rozbitím základního skeletu molekuly BV (Obr. 12).

Pro analýzu BV se využívají výše zmíněné metody. Výběr metody je závislý na předpokládaném obsahu BV ve vzorku. Pro měření nízkých koncentrací BV ve vzorcích (pod 20 nM) je vhodné využít metodu HPLC s TLS detekcí nebo LC/MS metody. Metoda HPLC s DAD detekcí je nejméně citlivá, tudíž je vhodná jen pro vyšší koncentrace BV. V živočišných i rostlinných vzorcích je endogenní hladina BV nízká a pohybuje se řádově v μM a nM koncentracích (Martelanc *et al.*, 2016). Výběr citlivých metod pro analýzu BV v biologických vzorcích je tedy nutný.



Obr. 12 Fragmentace molekuly BV-IX α probíhající v kolizní cele hmotnostního spektrometru. Ve fragmentačním spektru je věnována pozornost intenzitě fragmentu o m/z 297,3 (F1), který je hlavním produktem fragmentace BV (převzato z Nytofte *et al.*, 2011).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Rostlinný materiál

- Semena *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom
- Semena *Solanum lycopersicum* cv. Amateur

3.1.2 Použité chemikálie

- Acetonitril (Sigma-Aldrich, Německo)
- Agar (Sigma-Aldrich, Německo)
- Angeliho sůl (Sigma-Aldrich, Německo)
- Bilirubin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Biliverdin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Biliverdin-d₄ (Sigma-Aldrich, Německo)
- Butyl-hydroxytoluen (Sigma-Aldrich, Německo)
- Chlorid kademnatý (Sigma-Aldrich, Německo)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, Německo)
- Coomassie brilliant blue G250 (Bio-Rad, USA)
- Diethylamino-NONOát sodná sůl (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dimethylsulfoxid 99,9% (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethanol 96% (Lachema, Česká republika)
- Extrakt biliverdinreduktasy (připraveno v rámci bakalářské práce)
- Glukosa-6-fosfát (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hemin (Sigma-Aldrich, Německo)
- HEPES (Fisher Scientific, USA)
- Hexahydrát chloridu hořečnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydrogensulfid sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hydrogenuhlíčitán amonný (Sigma-Aldrich, Německo)

- Hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Jód (Lach-Ner, Česká republika)
- Jodid draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina thiobarbiturová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina trichloroctová (Lach-Ner, Česká republika)
- MES hydrát (Sigma-Aldrich, Německo)
- Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Murashige and Skoog Basal Medium (Duchefa, Nizozemsko)
- NADPH (Sigma-Aldrich, Německo)
- Nitroprusid sodný (Fisher Scientific, USA)
- Octan zinečnatý (Lach-Ner, Česká republika)
- Sacharosa (Sigma-Aldrich, Německo)
- Savo (Unilever, Česká republika)
- S-nitroso-N-acetylpenicillamin (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1,1,3,3-tetraethoxypropan (Sigma-Aldrich, Německo)

3.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Box Biohazard Bioban 48 (Schoeller, Česká republika)
- Centrifuga 5418R (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga MiniSpin (Sigma, Německo)
- Digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo)
- Digitální předvážky (KERN, Německo)
- Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)
- Fotoaparát Huawei P9 Lite (Huawei, Čína)
- Hmotnostní spektrometr TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Inkubátor nechlazený (Nüve, Turecko)
- Kulový mlýnek (Retsch, Německo)
- Laboratorní váhy (RADWAG, Česká republika)

- Lázeň ultrazvuková AU-32 (ArgoLab, Itálie)
- Lázeň ultrazvuková K5 (Kraintek, Česká republika)
- Lyofilizátor (Christ, Německo)
- Míchačka magnetická (IKA, Německo)
- Mikrodestičkový spektrofotometr Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)
- Mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko)
- Termostat blokový CH-100 (Biosan, Lotyšsko)
- Třepačka orbitální PSU-20i (Biosan, Lotyšsko)
- Třepačka temperovaná TS-100 (Biosan, Lotyšsko)
- UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Vortex (Stuart, UK)

3.3 Metody

3.3.1 Příprava pufrů, roztoků a médií

3.3.1.1 Pufr pro přípravu kultivačního média (25 mM HEPES, pH 7,4)

Na přípravu 250 ml pufru bylo naváženo 1,49 g HEPES. Navážka byla rozpuštěna v deionizované vodě a pomocí KOH bylo upraveno pH na hodnotu 7,4 a objem byl doplněn deionizovanou vodou na 250 ml.

3.3.1.2 Mobilní fáze pro UHPLC (20 mM roztok hydrogenuhličitanu amonného)

Na přípravu 500 ml roztoku bylo naváženo a rozpuštěno v deionizované vodě 0,7906 mg NH_4HCO_3 .

3.3.1.3 Extrakční pufr pro stanovení aktivity hemoxygenasy (0,1 M draselno-fosfátový pufr s 2 mM MgCl_2 , pH 7,4)

Na přípravu 500 ml pufru bylo naváženo:

- 2,7 g KH_2PO_4
- 5,2 g K_2HPO_4
- 0,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Navážky KH_2PO_4 a K_2HPO_4 byly rozpuštěny v deionizované vodě. Poté byla přidána a rozpuštěna navážka $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Pomocí KOH bylo upraveno pH na hodnotu 7,4 a objem byl doplněn deionizovanou vodou na 500 ml.

3.3.1.4 Příprava substrátů pro stanovení aktivity hemoxygenasy

- 5 mM hemin – navážka 6,5 mg na 2 ml fosfátového pufru
- 200 mM glukosa-6-fosfát (G6P) – navážka 121 mg na 2 ml fosfátového pufru
- 100 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (G6PDH) – 100 U bylo rozpuštěno v 1 ml fosfátového pufru s 10% glycerolem
- 3 mM BSA – navážka 3,96 g na 20 ml fosfátového pufru

Zásobní roztoky heminu a G6P byly rozpipetovány na alikvoty po 100 μl , G6PDH po 50 μl a BSA po 1 ml a zamrazeny.

- 10 mM NADPH – navážka 8,3 mg na 1 ml ddH₂O, roztok byl připraven vždy čerstvý a byl uchováván na ledu

3.3.1.5 Reakční pufr pro stanovení aktivity hemoxygenasy

Na přípravu 10 ml reakčního pufru bylo použito:

- 8,85 ml fosfátového pufru
- 50 μl heminu (25 μM)
- 50 μl G6P (1 mM)
- 50 μl G6PDH (0,5 U/ml)
- 1 ml BSA (300 μM)

Reakční pufr byl připraven vždy čerstvý a byl uchováván na ledu.

3.3.1.6 Roztok 200 μM bilirubinu

Na přípravu 10 ml roztoku bylo naváženo a rozpuštěno v DMSO 2,92 mg BR.

3.3.1.7 Roztok 0,5 mM heminu

Na přípravu 10 ml roztoku bylo naváženo a rozpuštěno v deionizované vodě 3,26 mg heminu.

3.3.1.8 Roztok 1 mM hydrogensulfidu sodného

Na přípravu 150 ml roztoku bylo naváženo a rozpuštěno v deionizované vodě 8,4 mg NaHS.

3.3.1.9 Roztok 10 mM chloridu kademnatého

Na přípravu 100 ml roztoku bylo naváženo a rozpuštěno v deionizované vodě 0,1833 g CdCl₂.

3.3.1.10 MS médium pro rajčata

Na přípravu 1 l MS média bylo naváženo:

- 4,3 g MS média s vitamíny
- 10 g sacharosy
- 0,145 g MES hydrátu

Navážky byly rozpuštěny v deionizované vodě. Pomocí KOH bylo upraveno pH na hodnotu 6,1 a objem byl doplněn deionizovanou vodou na 1 l. Byly naváženy 4 g agaru a přidány do 500 ml připraveného MS roztoku. Roztok byl vysterilizován v autoklávu.

3.3.1.11 Roztoky pro stanovení peroxidace lipidů

Na přípravu 100 ml činidla A bylo naváženo:

- 20 g kyseliny trichloroctové
- 0,01 g butyl-hydroxytoluenu

Navážky byly rozpuštěny ve 100 ml deionizované vody.

Na přípravu 100 ml činidla B bylo naváženo:

- 20 g kyseliny trichloroctové
- 0,01 g butyl-hydroxytoluenu
- 0,65 g kyseliny thiobarbiturové

Navážky byly rozpuštěny ve 100 ml deionizované vody.

3.3.1.12 Extrakční činidlo pro stanovení peroxidace lipidů

Na přípravu 500 ml extrakčního činidla bylo smícháno 400 ml ethanolu a 100 ml 20% kyseliny trichloroctové. Pro přípravu 20% kyseliny trichloroctové bylo potřeba navážít a rozpustit 20 g kyseliny trichloroctové ve 100 ml deionizované vody.

3.3.1.13 Zásobní 10 μ M roztok biliverdinu

Navážka 3,1 mg BV byla rozpuštěna v 50 ml HEPES pufru.

3.3.1.14 Roztoky látek uvolňujících RNS

- 10 mM DEA-NO - navážka 2,1 mg rozpuštěna v 1 ml DMSO
- 10 mM SNAP - objem 220 μ l zásobního roztoku (45,4 mM) rozpuštěn v 780 μ l DMSO
- 10 mM AS - navážka 1,22 mg rozpuštěna v 1 ml DMSO
- 10 mM SNP - navážka 29,8 mg rozpuštěna v 10 ml deionizované vody

3.3.1.15 Roztoky pro fluorimetrickou kvantifikaci biliverdinu

- 5% octan zinečnatý - navážka 2,5 g byla rozpuštěna v 50 ml methanolu
- 0,006% jód a 0,008% jodid draselný - navážky 0,003 g jódu a 0,004 g jodidu draselného byly rozpuštěny v 50 ml methanolu
- zásobní 1 mg/ml roztok standardu BV - navážka 1 mg BV byla rozpuštěna v 1 ml chloroformu

3.3.2 Sterilizace a klíčení semen

Semena *Solanum lycopersicum* byla sterilizována 70% ethanolem po dobu 30 sekund. Po odsátí ethanolu byla semena propláchnuta sterilní deionizovanou vodou. Po odsátí sterilní deionizované vody byla semena dále sterilizována 30% roztokem Sava po dobu 30 minut. Po odsátí roztoku Sava byla semena třikrát propláchnuta sterilní deionizovanou vodou. Po promytí byla semena přenesena na vrstvu sterilních filtračních papírů (sterilizovány v autoklávu) vlhčených sterilní deionizovanou vodou ve sterilních Petriho miskách. Na každou misku bylo přeneseno v průměru 100 semen. Petriho misky byly obaleny parafilmem a umístěny do inkubátoru, ve kterém semena klíčila po dobu 3 dnů při teplotě 25°C.

3.3.3 Kultivace semenáčků rajčat na pevném agarovém MS médiu

Byl připraven zásobní roztok 10 mM CdCl₂ a sterilní agarové MS médium. Pracovalo se ve sterilním prostředí. Na každou sterilní čtvercovou misku bylo vždy nalito 30 ml média. První skupina misek sloužila jako kontrola a neobsahovala CdCl₂. Další skupiny misek obsahovali médium s přidavkem CdCl₂ v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM. Pro přípravu 30 ml média s 50 μM CdCl₂ bylo přidáno 150 μl 10 mM CdCl₂. Pro přípravu 30 ml média se 100 μM CdCl₂ bylo přidáno 300 μl 10 mM CdCl₂. Pro přípravu 30 ml média s 200 μM CdCl₂ bylo přidáno 600 μl 10 mM CdCl₂. Pro přípravu 30 ml média s 500 μM CdCl₂ bylo přidáno 1,5 ml 10 mM CdCl₂. Po ztuhnutí médií bylo na každou misku s médiem přeneseno 10 sterilních naklíčených semen *Solanum lycopersicum*, které byly vyrovnány do řady v horní části misky. Misky byly obaleny parafilmem a umístěny do fytotronu, kde byly semenáčky kultivovány na médiu po dobu 10 dní při teplotě 23°C a 12-ti hodinové fotoperiodě světlo/tma. Po skončení kultivace byly misky vyfotografovány a v programu *ImageJ* 1.33 software (National Institute of Health, USA) byla změřena délka kořenů. Po vyfotografování byly semenáčky vytaženy z média, očištěny od zbytků agaru a skalpelem od sebe byly odděleny kořenové a nadzemní části. Získané množství rostlinného materiálu bylo zváženo a zamrzeno pro další použití.

3.3.4 Kultivace semenáčků rajčat na filtračním papíru

Naklíčená semena *Solanum lycopersicum* byla přenesena do nových Petriho misek na vrstvu filtračních papírů, které byly vlhčené 4 ml deionizované vody nebo 1 mM roztoku NaHS nebo 0,5 mM roztoku heminu. Každá miska obsahovala 10 naklíčených semen. Petriho misky byly obaleny parafilmem a umístěny do fytotronu, kde byla naklíčená semena inkubována s danými roztoky po dobu 6 hodin za světla při teplotě 23°C. Po inkubaci byly skalpelem odřezány kořínky, zváženy a zamrzeny pro další použití.

Od každé experimentální skupiny misek, kde byl filtrační papír vlhčený jiným roztokem, byla ponechána jedna miska pro sledování vlivu aplikovaných roztoků na tvorbu kořenového systému. Tyto misky byly inkubovány s danými roztoky po dobu 7 dní při teplotě 23°C a 12-ti hodinové fotoperiodě světlo/tma. Po inkubaci byly semenáčky vyfotografovány a byl spočítán počet postranních kořenů.

3.3.5 Příprava rostlinných vzorků

Pro stanovení aktivity HO byly vzorky připravovány na ledu s využitím chlazené centrifugy. Rostlinný materiál byl homogenizován ve vychlazené třecí misce s vychlazeným extrakčním pufrem v poměru 1:4. Homogenizovaný materiál byl přenesen do mikrozkuavek a centrifugován v centrifuze vychlazené na 4°C při 16000 xg po dobu 10 minut. Do čistých mikrozkuavek byl odpipetován supernatant, který byl uchováván na ledu a byl využit jako vzorek pro měření aktivity HO.

Pro stanovení peroxidace lipidů byl rostlinný materiál homogenizován ve třecí misce s připraveným extrakčním činidlem v poměru 1:2. Homogenizovaný materiál byl přenesen do mikrozkuavek a centrifugován v centrifuze při 13000 xg po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Do čistých mikrozkuavek byl odpipetován supernatant, který byl využit jako vzorek pro měření peroxidace lipidů.

Pro stanovení BV byl rostlinný materiál umístěn do třecí misky, zalit dostatečným množstvím tekutého dusíku a rozdrcen na prášek, který byl přenesen do mikrozkuavky. V poměru 1:2 byl do mikrozkuavky přidán methanol. Mikrozkuavka se směsí methanolu a rostlinného vzorku byla umístěna do ultrazvuku po dobu 15 minut. Poté byla směs centrifugována při 16000 xg po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Do čistých mikrozkuavek byl odpipetován supernatant, který byl využit jako vzorek pro měření obsahu BV. Vzorky byly před samotným měřením přefiltrovány přes stříkačkové filtry (Chromservis, Česká republika).

V jiné variantě byl pro stanovení BV čerstvý rostlinný materiál umístěn do lyofilizátoru a přes noc vysušen. Vysušený materiál byl ručně podrcen na malé kousky a do mikrozkuavky bylo naváženo potřebné množství suchého materiálu. Materiál v mikrozkuavce byl rozdrcen na prášek v kulovém mlýnku za pomoci kovové kuličky. Po homogenizaci byl do mikrozkuavky v poměru 1:10 přidán methanol. Mikrozkuavka se směsí methanolu a rostlinného vzorku byla umístěna do ultrazvuku po dobu 15 minut. Poté byla směs centrifugována při 16000 xg po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Do čistých mikrozkuavek byl odpipetován supernatant, který byl využit jako vzorek pro měření obsahu BV. Vzorky byly před samotným měřením přefiltrovány přes stříkačkové filtry.

3.3.6 Stanovení množství proteinů ve vzorku Bradfordovou metodou

Nejprve byl připraven čerstvý roztok pracovního činidla Bradfordové a to tak, že zvolený objem zásobního roztoku Coomassie Blue G250 byl ředěn v poměru 1:4 deionizovanou vodou (na 10 ml pracovního roztoku: 2 ml Coomassie Blue a 8 ml ddH₂O). Stanovení proteinů bylo provedeno měřením v mikrodestičkách.

Do jamek mikrodestičky bylo pipetováno 45 µl deionizované vody, 5 µl vzorku a 200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Reakční směs byla jemně protřepána a 5 minut bylo ponecháno vyvíjet zbarvení. Poté byla pomocí mikrodestičkového spektrofotometru změřena absorbance při 595 nm. Pro každý vzorek byla provedena tři opakování v mikrodestičce.

3.3.7 Stanovení aktivity hemoxygenasy

Před každým měřením byl připraven čerstvý reakční pufr a roztok NADPH. Pro stanovení byl využit preparát enzymu BVR připravený z vepřové sleziny v rámci bakalářské práce.

Do jamek mikrodestičky bylo pipetováno 200 µl reakčního pufru, 30 µl extraktu BVR a 20 µl vzorku (jako blank použít pufr). Takto připravená reakční směs byla inkubována po dobu 5 minut při 37°C. Poté byla reakce zahájena přidáním 20 µl NADPH do každé jamky. Pomocí mikrodestičkového spektrofotometru byly měřeny změny fluorescence (excitace 441 nm, emise 528 nm) po dobu 60 minut v intervalu 1 minuta. Pro každý vzorek byla provedena tři opakování měření v mikrodestičce.

3.3.8 Stanovení peroxidace lipidů

Pro stanovení peroxidace lipidů v rostlinném materiálu byla zvolena korigovaná TBARS metoda, která zahrnuje korekci vlivu interferujících látek. Pro každý vzorek byla provedena zvlášť reakce s činidlem A a zvlášť reakce s činidlem B. Ke vzorku v mikrozkuhavce byl přidán stejný objem činidla A nebo činidla B. Reakční směs v mikrozkuhavce byla zahřívána v termobloku při 75°C po dobu 30 minut. Poté byla ochlazená na ledové lázni a centrifugována v centrifuze při 15000 xg po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Do jamek mikrodestičky bylo pipetováno 200 µl supernatantu. Pomocí mikrodestičkového spektrofotometru byla změřena absorbance supernatantu při 440; 532 a 600 nm. Pro každý vzorek byla provedena tři opakování měření v mikrodestičce.

Vyhodnocení stanovení peroxidace lipidů probíhalo na základě těchto kroků:

Činidlo A = -TBA

Činidlo B = +TBA

1. $[(\text{Abs } 532+\text{TBA} - \text{Abs } 600+\text{TBA}) - (\text{Abs } 532-\text{TBA} - \text{Abs } 600-\text{TBA})] = A$
2. $[(\text{Abs } 440+\text{TBA} - \text{Abs } 600+\text{TBA}) \times 0.0571] = B$
3. obsah MDA (nmol /ml) = $[(A-B) / 157\ 000] \times 10^6$

3.3.9 Metoda UHPLC-MS/MS analýzy biliverdinu

Pro stanovení biliverdinu byla v rámci diplomové práce vyvinuta metoda UHPLC analýzy ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Rozdělení analytů ve vzorku probíhalo na koloně Acquity BEH C18 (2,1 x 100 mm, velikost částic 1,7 μm ; Waters, USA) která byla vybavena předkolonkou. Vzorek byl nanášen v objemu 2 μl . Eluce probíhala gradientově za využití mobilních fází 20 mM roztoku NH_4HCO_3 a 100% methanolu. Gradient mobilní fáze je zobrazen v Tab. 1. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,2 ml/min. Detekce BV probíhala pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie, kdy v pozitivním módu byl pro fragmentaci vybírán mateřský ion o m/z 583. Po fragmentaci byly detekovány ionty o m/z 297. Napětí v kolizní cele bylo 40 V. Retenční čas BV byl 6,5 minuty.

Tab. 1: Gradient mobilní fáze pro analýzu BV.

Čas (min)	20 Mm NH_4HCO_3 (%)	100% methanol (%)
0	80	20
1	80	20
6	5	95
8	5	95
8	80	20
12	80	20

3.3.10 Kalibrace UHPLC-MS/MS metody za využití interního standardu biliverdinu-d₄

Byly připraveny zásobní roztoky standardu BV o koncentracích 2000, 1000, 200, 100, 20, 10, 2, 1, 0,2 a 0,1 ng/ml. Byl připraven zásobní roztok interního standardu BV-d₄ o koncentraci 20 ng/ml. Připravené zásobní roztoky BV a BV-d₄ byly smíchány v poměru 1:1, tudíž výsledné koncentrace standardu BV byly 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1 a 0,05 ng/ml a obsahovaly vždy 10 ng/ml interního standardu BV-d₄. Standard BV a interní standard BV-d₄ byly stanoveny zavedenou UHPLC-MS/MS metodou analýzy BV, kdy byly detekovány současně ionty standardů BV a BV-d₄. Pro BV-d₄ byl fragmetnován mateřský ion o m/z 587 za vzniku iontu o m/z 299, který byl detekován. Integrace píků byla provedena automaticky za využití programu XCALIBUR 3.1 (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.3.11 Analýza interakce biliverdinu s RNS

Do jamek mikrodestičky bylo napipetováno 198 μ l 10 μ M BV v HEPES pufru. Do jamky byly přidány vždy 2 μ l 10 mM roztoku RNS (výsledná koncentrace 100 μ M). Pomocí mikrodestičkového spektrofotometru byly měřeny změny absorbance při 370 nm po dobu 60 minut co 5 minut. Pro každý roztok RNS byla provedena tři opakování měření v mikrodestičce. Jako blank pro tato měření bylo použito 200 μ l HEPES pufru. Souběžně s měřením změn absorbance BV po přidavku RNS byly měřeny změny absorbance zásobního 10 μ M BV v HEPES pufru, pro sledování samovolné degradace BV v průběhu měření.

3.3.12 Fluorimetrická kvantifikace biliverdinu

Do mikrozkušavky bylo napipetováno 100 μ l standardu BV nebo vzorku. Poté bylo přidáno 50 μ l acetátu zinečnatého a ihned bylo přidáno 5 μ l oxidačního činidla, kterým byl roztok jódu a jodidu draselného. Reakční směs v mikrozkušavce byla řádně promíchána a inkubována po dobu 10 sekund. Poté byla zředěna 1 ml methanolu. Do jamek mikrodestičky bylo pipetováno 200 μ l. Pomocí mikrodestičkového spektrofotometru byla změřena fluorescence (excitace 345 nm, emise 700 nm).

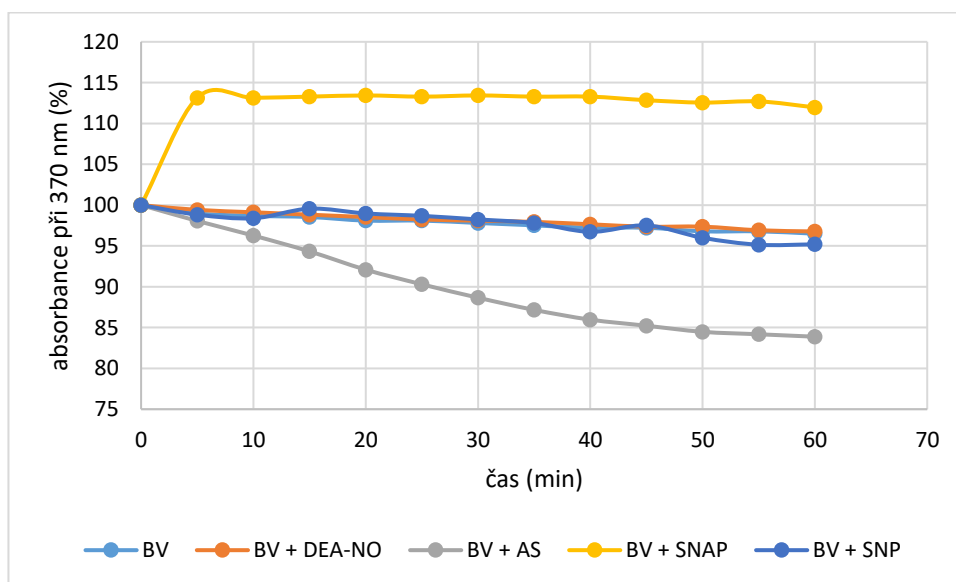
3.3.13 Statistické vyhodnocení dat

Experimentálně stanovená data byla statisticky vyhodnocena za využití dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ v programu Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). V grafech jsou zobrazeny hodnoty průměrů s odchylkami.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení interakce biliverdinu s RNS

Byla zavedena metoda stanovení interakce BV s RNS dle postupu publikovaného v literatuře (Kaur *et al.*, 2003). Princip metody je takový, že k BV rozpuštěnému ve fyziologickém roztoku byla přidána látka působící jako donor RNS. S využitím destičkového spektrofotometru byly při vlnové délce 370 nm sledovány změny absorbance 10 μ M roztoku BV bez a s přidavkem donoru RNS po dobu 1 hodiny (Obr. 13). Jako donory RNS byly dle literatury zvoleny chemikálie diethylamino-NONOát (DEA-NO), Angeliho sůl (AS, trioxodinitrát sodný), S-N-acetylpenicillamin (SNAP) a nitroprusid sodný (SNP). Nevýznamné změny absorbance BV bez přidavku donoru RNS potvrdily jeho stabilitu a pomalou samovolnou degradaci BV v průběhu použité doby měření. Byl zaznamenán mírný pokles absorbance v důsledku snížení koncentrace BV vlivem interakce s RNS pouze po aplikaci chemikálie AS. Ostatní donory RNS nezpůsobily změnu absorbance roztoků BV v důsledku reakce vedoucí k očekávanému poklesu koncentrace BV. Důvodem zvýšené absorbance u vzorku BV s přidavkem chemikálie SNAP je absorbance této látky v použité části spektra (připravený zásobní roztok této chemikálie měl světle zelenou barvu).

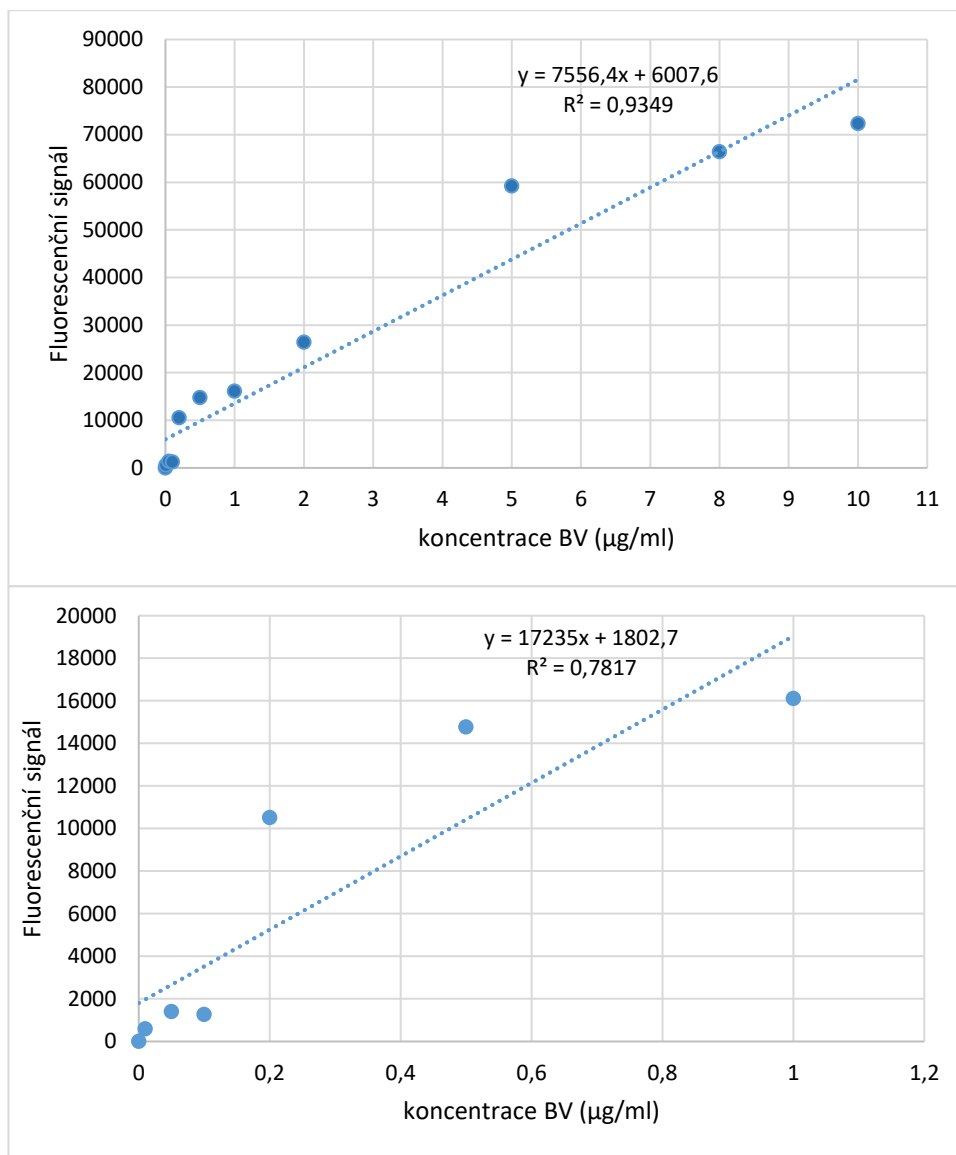


Obr. 13 Změny absorbancí při 370 nm 10 μ M BV po přidavku donorů: diethylamino-NONOát (DEA-NO), Angeliho sůl (AS), S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) a nitroprusid sodný (SNP). Jako hodnota 100 % byla použita hodnota absorbance roztoku BV v čase 0.

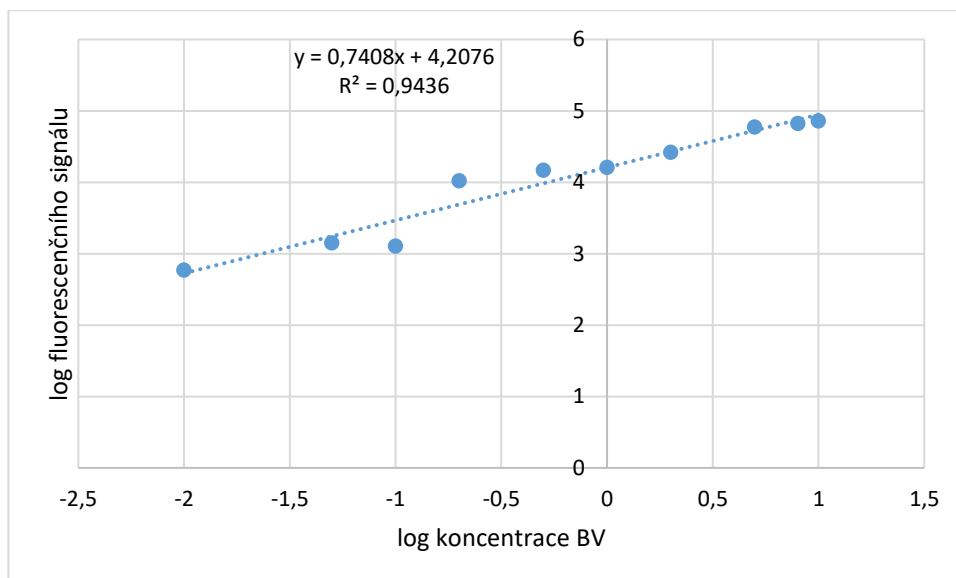
4.2 Analýza obsahu biliverdinu v rostlinném materiálu

4.2.1 Fluorimetrická kvantifikace biliverdinu

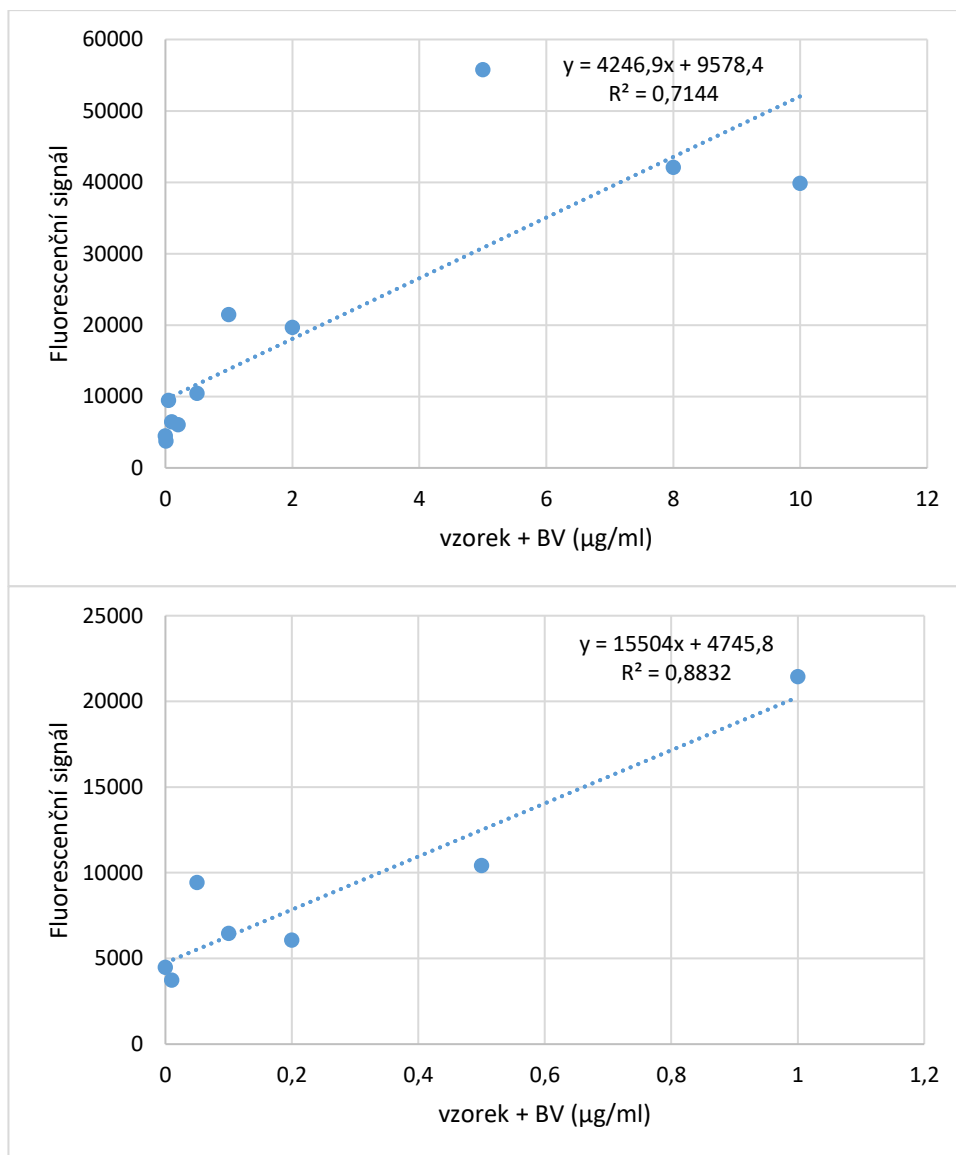
Byla zavedena metoda fluorimetrické kvantifikace BV dle postupu publikovaného v literatuře (Gardikas *et al.*, 1950). Princip metody je založen na oxidaci BV v prostředí acetátu zinečnatého oxidačním činidlem, kterým byl jód v roztoku jodidu draselného za vzniku fluoreskující zinečnaté soli purpurinu. Reakční směs byla zředěna methanolem za účelem získání vhodné intenzity fluorescenčního signálu. Nejprve byla pro tuto metodu provedena kalibrace s využitím standardu BV (obr. 14 a 15). Následně bylo testováno možné využití této metody pro stanovení obsahu BV v extraktech z kořenů rajčat. Za účelem zjištění vlivu reálného vzorku na kalibrační měření s čistým standardem BV byly ke 100 μl rostlinného vzorku přidány jednotlivé body kalibrační řady (Obr. 16). Po provedení reakce s reakčními činidly se předpokládal možný mírný nárůst fluorescenčního signálu pro všechny body kalibrační řady. Získaná data ale nezaznamenala vždy nárůst signálu, naopak docházelo i k poklesu fluorescenčního signálu oproti kalibrační řadě. Tento způsob stanovení se ukázal jako málo citlivý pro stanovení BV v rostlinných extraktech a dále už nebyl využíván.



Obr. 14 Závislost intenzity fluorescenčního signálu na koncentraci BV v rozsahu 0,01 - 10 µg/ml a 0,01 - 1 µg/ml.



Obr. 15 Závislost logaritmu intenzity fluorescenčního signálu na logaritmu koncentrace BV v koncentračním rozsahu 0,01 - 10 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 16 Závislost intenzity fluorescenčního signálu na koncentraci BV v reálném vzorku v rozsahu 0,01 - 10 µg/ml a 0,01 - 1 µg/ml.

4.2.2 Vývoj a optimalizace metody UHPLC-MS/MS analýzy biliverdinu

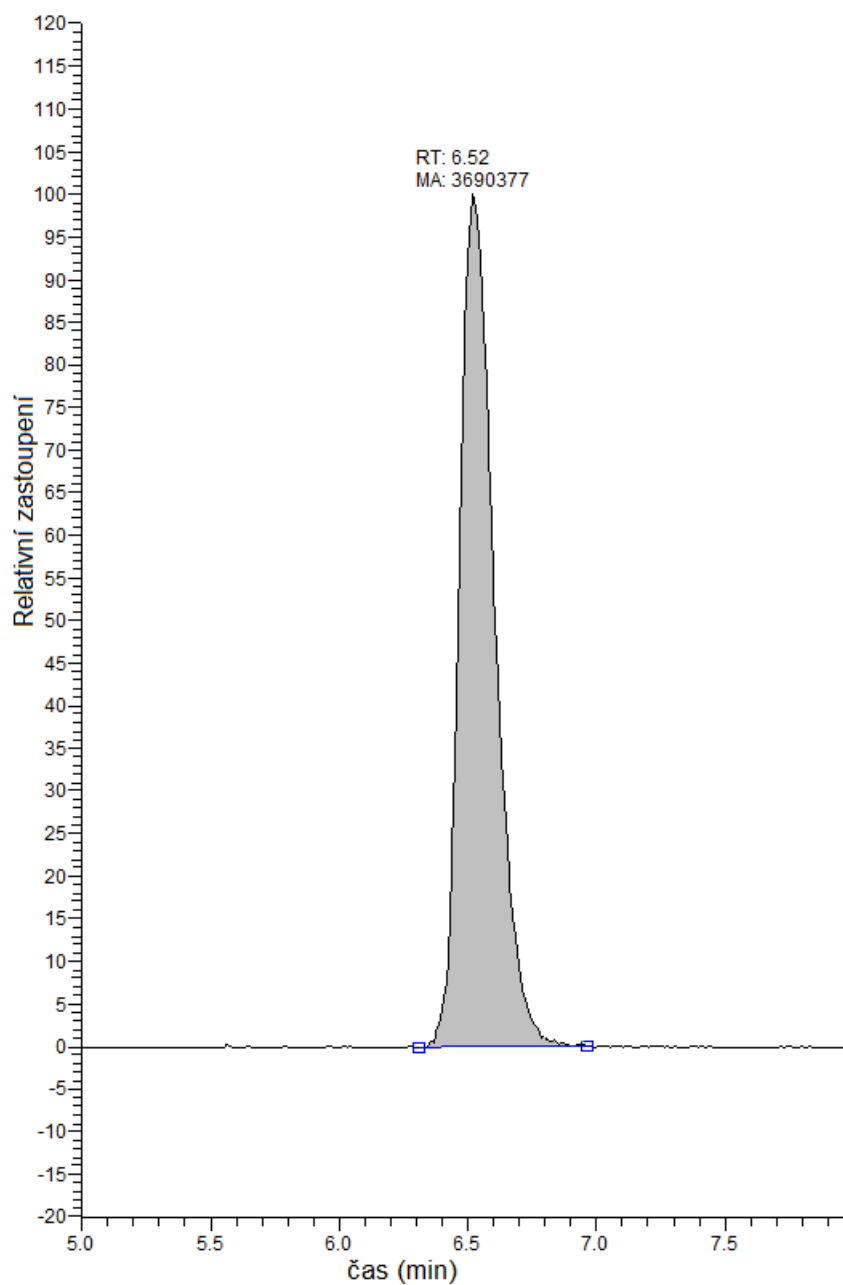
Při vývoji metody pro stanovení BV v rostlinných vzorcích se vycházelo z publikace Martelanc *et al.*, 2016. Tato práce se zabývala stanovením BR a BV v lidském séru pomocí metody HPLC a byly z ní využity informace o koloně, eluci a složení mobilní fáze pro HPLC. Na základě získaných informací z publikace probíhaly v rámci zavedení metody prvotní separace vzorku standardu BV na koloně C18 a eluce byla prováděna

izokraticky 20 mM roztokem acetátu amonného o pH 6,7 - 7,3 bez obsahu organické složky a následně s obsahem 60% methanolu. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,2 ml/min. Detekce rozdělených molekul probíhala za využití DAD při vlnových délkách 377, 407, 457 a 650 nm. Na kolonu byly nanášeny vzorky standardu BV o koncentraci 100 a 10 $\mu\text{g/ml}$ a objemu 2 a 5 μl . Chromatografický pík z takto provedené analýzy byl asymetrický zepředu i zezadu. Z toho důvodu byla mobilní fáze 20 mM acetátu amonného nahrazena 20 mM hydrogenuhličitanem amonným o pH 7- 8,5.

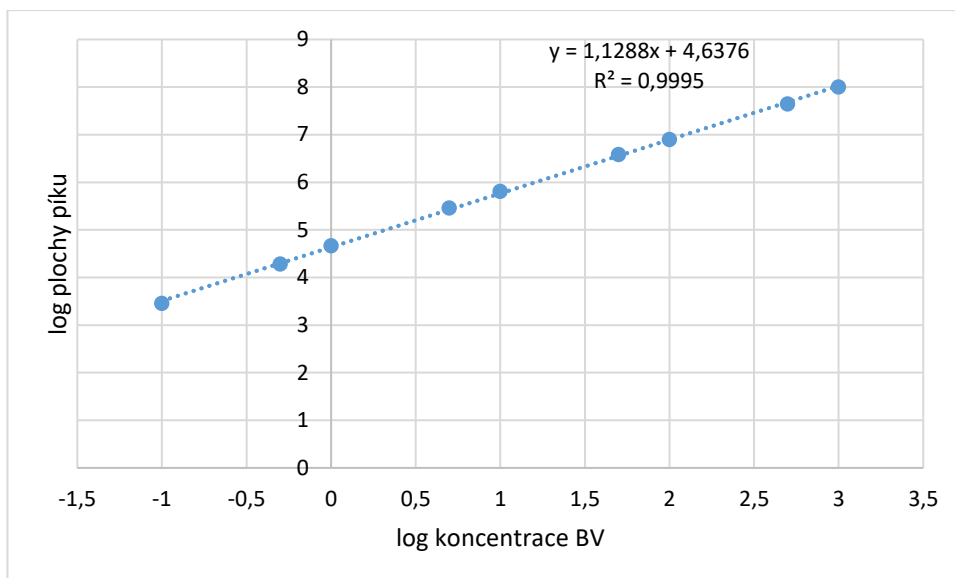
Z důvodu zachytávání BV na koloně byl vzorek do systému nanášen pouze v objemu 2 μl . Současně byla izokratická eluce nahrazena elucí gradientovou, kde jako druhá složka mobilní fáze byly testovány acetonitril a následně methanol. Ulpívání BV na jehle odebírající vzorky v autosampleru přístroje bylo zamezeno nastavením oplachu jehly před a po odběru vzorku v methanolu.

Současně v důsledku obsahu BV v rostlinných vzorcích pod limit detekce DAD byla jako vhodná detekce zvolena detekce tandemovou hmotností spektrometrií. Potřebné informace o chování BV při analýze tandemovou hmotnostní spektrometrií byly získány z práce Nytofte *et al.*, 2011. Tato práce uvádí, že fragmentací mateřského iontu o m/z 583 vzniká fragment o m/z 297. Pro fragmentaci BV bylo nutné navýšit napětí v kolizní cele až na 40 V, jelikož při nižších napětí k fragmentaci nedocházelo. Chromatografický pík z takto provedené analýzy je symetrický a dává informace o relativním zastoupení iontu BV, které vyjadřuje podíl BV ve vzorku v daném čase a je závislé na signálu z detektoru (Obr. 17).

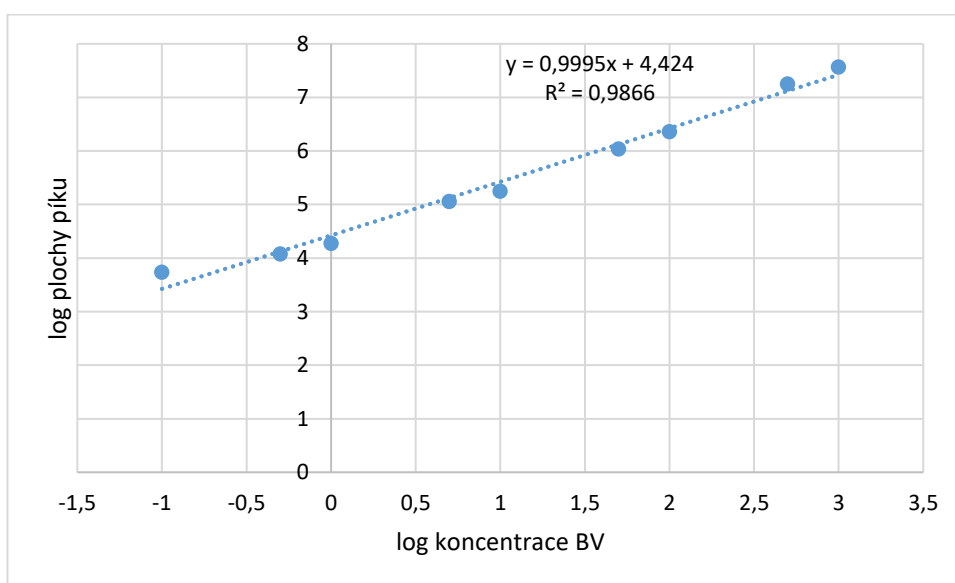
V rámci testování využití methanolu a acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze byly provedeny kalibrace s oběma organickými rozpouštědly (Obr. 18 a 19). Metodou lineární regrese byly pro obě kalibrace získány hodnoty koeficientu determinace R^2 , které byly porovnány a jako druhá složka mobilní fáze pro gradientovou eluci byl vybrán methanol.



Obr. 17 Chromatografický pík standardu BV o koncentraci 100 ng/ml s retenčním časem 6,5 minuty.



Obr. 18 Kalibrace UHPLC-MS/MS metody analýzy BV v rozsahu koncentrací 0,1 - 1000 ng/ml při použití methanolu jako organické fáze.

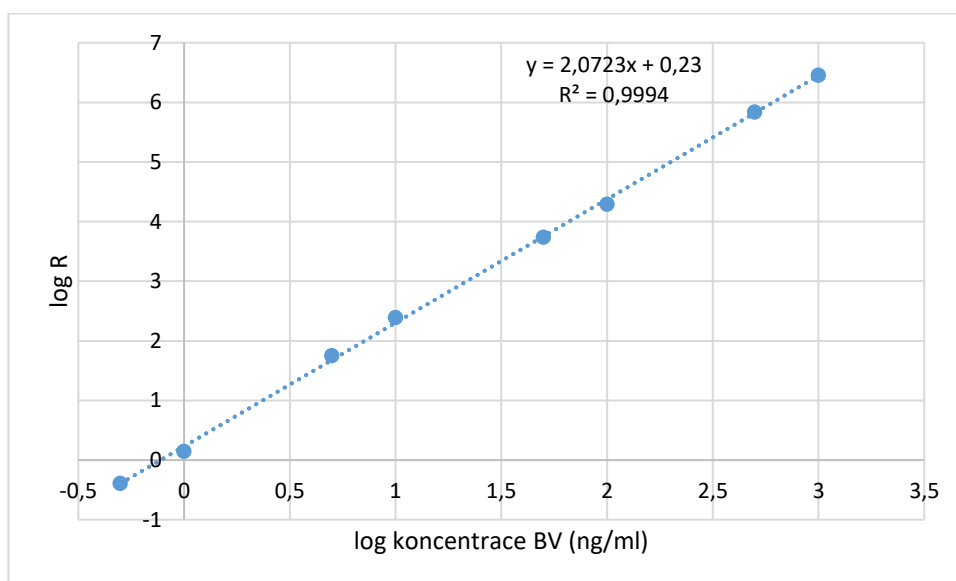


Obr. 19 Kalibrace UHPLC-MS/MS metody analýzy BV v rozsahu koncentrací 0,1 - 1000 ng/ml při použití acetonitrilu jako organické fáze.

4.2.3 Kalibrace UHPLC-MS/MS metody za využití interního standardu biliverdinu-d₄

Pro zavedenou UHPLC-MS/MS metodu byla provedena kalibrace za využití standardu BV značeného 4 atomy deuteria (BV-d₄). K připravené koncentrační řadě standardů BV v rozsahu koncentrací 1000 - 0,05 ng/ml byl přidán BV-d₄ ve finální koncentraci 10 ng/ml. Výběr koncentrace 10 ng/ml pro BV-d₄ vychází z toho, že se jedná o bod nacházející se ve středu kalibrační řady a současně o koncentraci podobnou pozorovaným endogenním koncentracím BV v rostlinných vzorcích. Experimentálně stanovená data byla zpracována a vynesena do grafu (Obr. 20). Na osu x se obdobně jako u běžné kalibrace vynáší logaritmus koncentrace BV, zatímco na osu y se vynáší logaritmus odezvy (R), které se vypočítá dle vzorce:

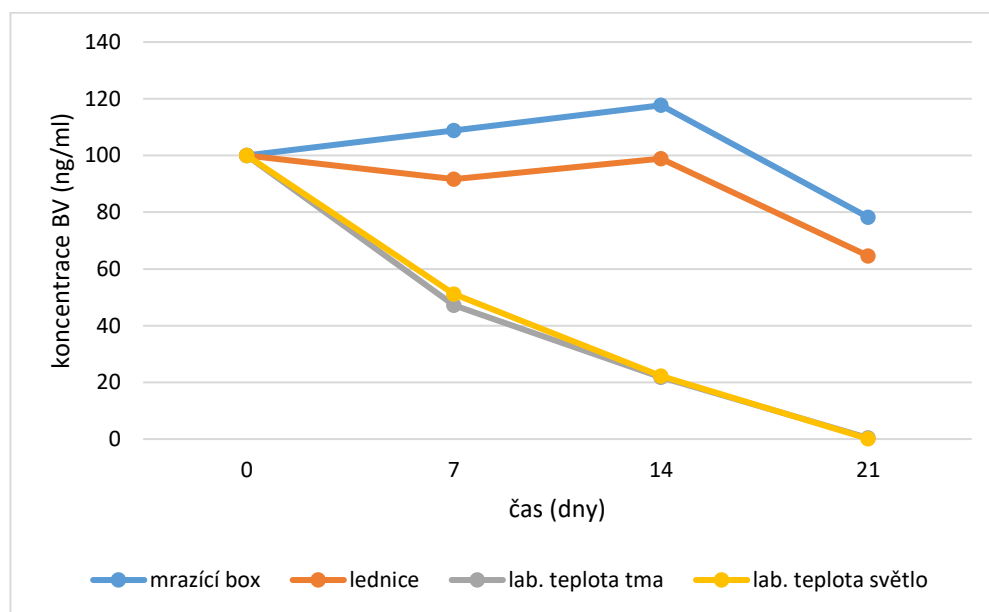
$$R = (\text{plocha píku BV/plocha píku BV-d}_4) * c \text{ BV}$$



Obr. 20 Kalibrace UHPLC-MS/MS metody analýzy BV v rozsahu koncentrací 0,5 - 1000 ng/ml za využití BV-d₄ o koncentraci 10 ng/ml.

4.2.4 Stabilita biliverdinu

Pro tento experiment byl připraven zásobní roztok BV v methanolu o koncentraci 100 ng/ml, který byl po stanovení přesné koncentrace BV za pomoci kalibrace zavedenou metodou UHPLC-MS/MS rozdělen do čtyř vialek po 1 ml. Každá z vialek s roztokem BV byla uchovávána rozdílným způsobem. První byla uložena do mrazícího boxu (-20°C), druhá do lednice (4°C), třetí byla skladována při laboratorní teplotě ve tmě a čtvrtá při laboratorní teplotě na polici za přístupu světla (22°C). Koncentrace BV byla v jednotlivých vzorcích stanovena za pomoci kalibrace zavedenou metodou UHPLC-MS/MS a to vždy po 7 dnech od předchozího měření. Na Obr. 21 je graf znázorňující změny koncentrací BV při rozdílném způsobu skladování vzorku. Z výsledků je patrné, že při uchovávání roztoku BV v mrazícím boxu nedocházelo během prvních 14 dní k významnější degradaci BV, zatímco po 21 dnech došlo k úbytku BV o 20 %. U roztoku BV skladovaného v lednici byl zaznamenán mírný úbytek BV již po 7 dnech, po 21 dnech bylo degradováno 30 % BV ve vzorku. BV ve vzorcích uchovávaných při laboratorní teplotě ve tmě a za přístupu světla byl v průběhu experimentu zcela degradován.

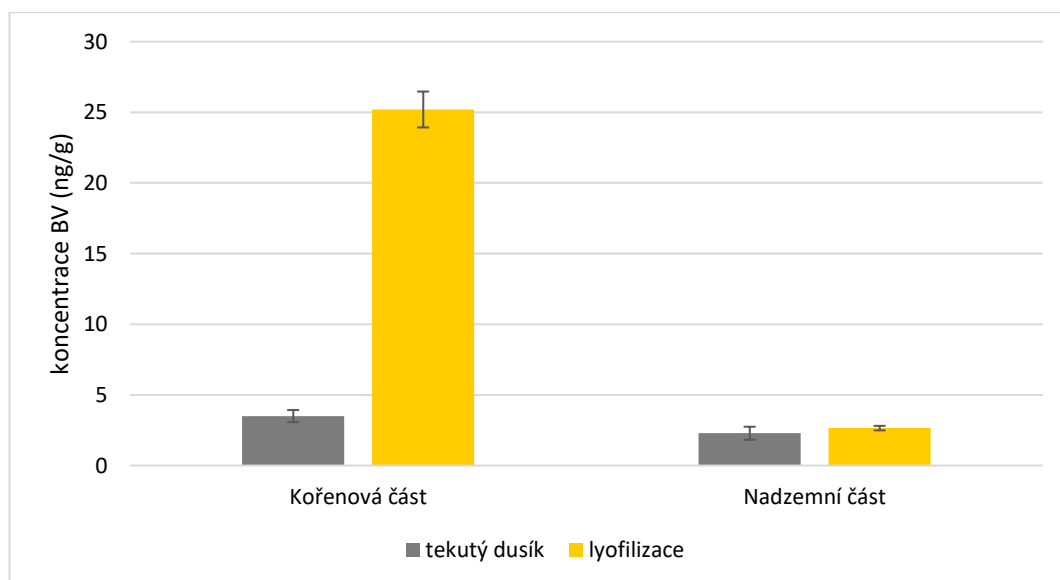


Obr. 21 Změny koncentrací BV v čase v závislosti na způsobu skladování vzorku.

4.2.5 Vliv přípravy vzorku na obsah biliverdinu

Obsah BV byl stanoven ve vzorcích připravených různými metodami z čerstvých kořenových a nadzemních částí 14-ti denních semenáčků rajčat (Obr. 22). Čerstvé vzorky byly připraveny homogenizací v tekutém dusíku nebo extrakcí vysušeného materiálu lyofilizací. Lyofilizací je vzorek zcela zbaven obsahu vody, tudíž navážené množství materiálu obsahuje výrazně větší množství organických a anorganických látek než materiál homogenizovaný za pomoci tekutého dusíku. Z grafu je patrné, že vzorek z kořenové části připravený lyofilizací obsahuje pětinasobné množství BV než vzorek z kořenové části připravený homogenizací v tekutém dusíku. Ve vzorcích připravených z nadzemních částí bylo naměřeno přibližně stejné množství BV při obou způsobech přípravy.

Je nutno zdůraznit, že ke stejné navážce homogenizovaného rostlinného materiálu byl přidán methanol v rozdílném množství. K rostlinnému materiálu po homogenizaci v tekutém dusíku byl methanol přidán v poměru 1:2, zatímco po lyofilizaci v poměru 1:10. Tento postup byl nutný z důvodu nižší hustoty vysušeného materiálu, kdy množství se stejnou hmotností zaujímal větší objem ve srovnání s materiálem homogenizovaným v tekutém dusíku.



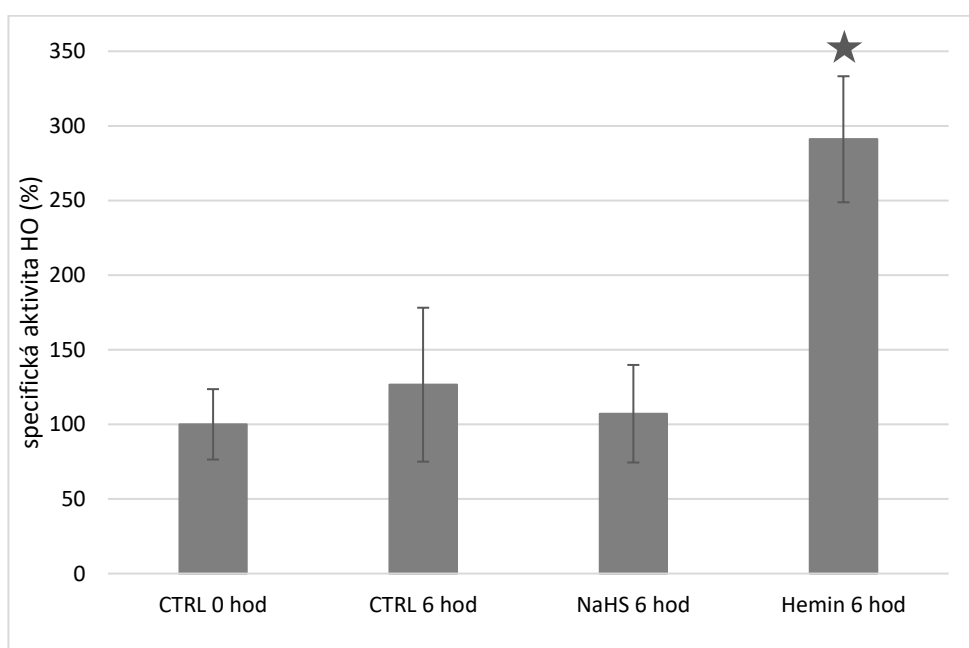
Obr. 22 Srovnání obsahu BV ve vzorcích připravených z kořenové a nadzemní části semenáčků rajčete. Vzorky byly připraveny homogenizací čerstvého rostlinného materiálu v tekutém dusíku nebo za využití lyofilizátoru.

4.3 Vliv induktorů hemoxygenasy na aktivitu hemoxygenasy, hladiny biliverdinu a vývoj kořenového systému semenáčků rajčete

4.3.1 Stanovení aktivity hemoxygenasy

V této části práce byly použity 3-denní semenáčky *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom, které byly inkubovány na filtračním papíru s roztoky induktorů HO (1 mM NaHS a 0,5 mM heminem), zatímco kontrolní semenáčky byly inkubovány s vodou.

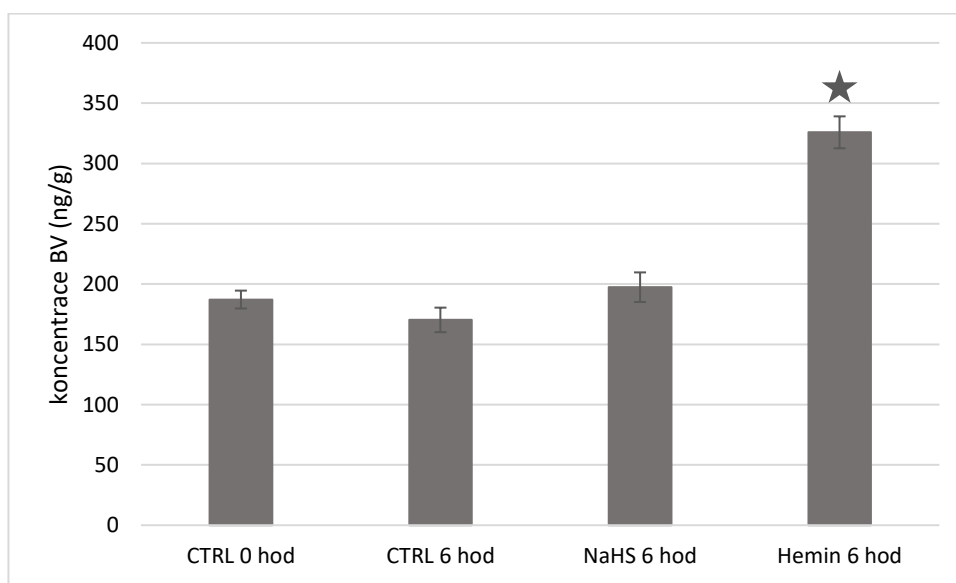
V extraktech připravených z kořenů 3-denních semenáčků před a po 6 hodinové inkubaci s vodou, 1 mM NaHS a 0,5 mM heminem byla stanovena specifická aktivita HO (Obr. 23). Specifická aktivita HO se po 6 hodinové inkubaci s vodou a NaHS významně neliší od specifické aktivity HO stanovené před zahájením inkubace, naopak po inkubaci s heminem byl zaznamenán výrazný nárůst specifické aktivity HO.



Obr. 23 Specifická aktivita HO v kořenech 3-denních semenáčků inkubovaných po dobu 6 hodin s deionizovanou vodou (CTRL), 1 mM NaHS a 0,5 mM heminem. Jako hodnota 100 % byla brána hodnota specifické aktivity HO stanovená před zahájením inkubace (CTRL 0 hod). Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

4.3.2 Stanovení koncentrace biliverdinu

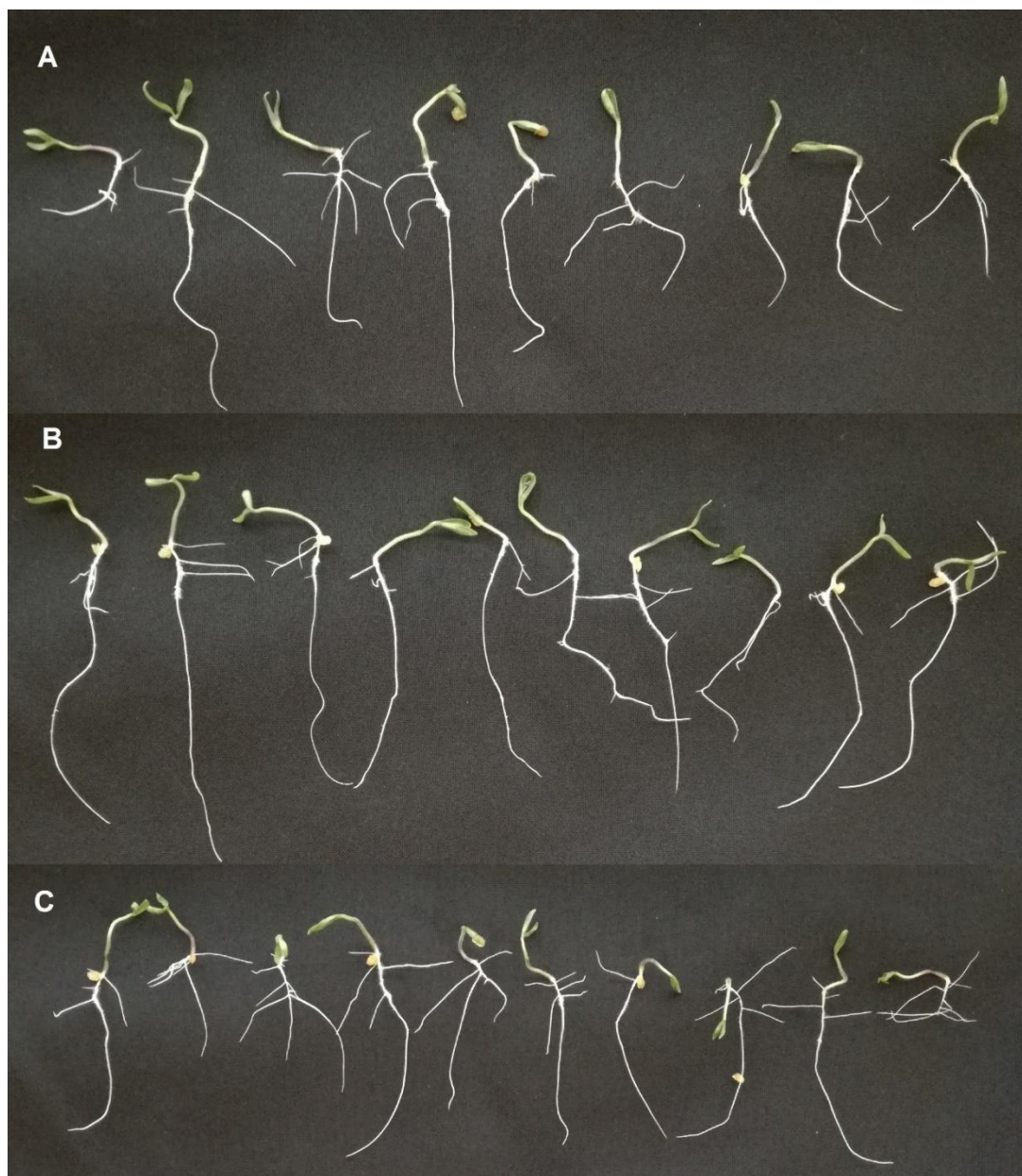
Ve vzorcích kořenů 3-denních semenáčků inkubovaných s vodou, 1 mM NaHS a 0,5 mM heminem byla provedena analýza hladiny BV optimalizovanou UHPLC-MS/MS metodou (Obr. 24). Po 6 hodinové inkubaci s NaHS se obsah BV významně neliší od obsahu BV v kontrolních vzorcích. Naproti tomu po inkubaci s heminem došlo k výraznému nárůstu obsahu BV.



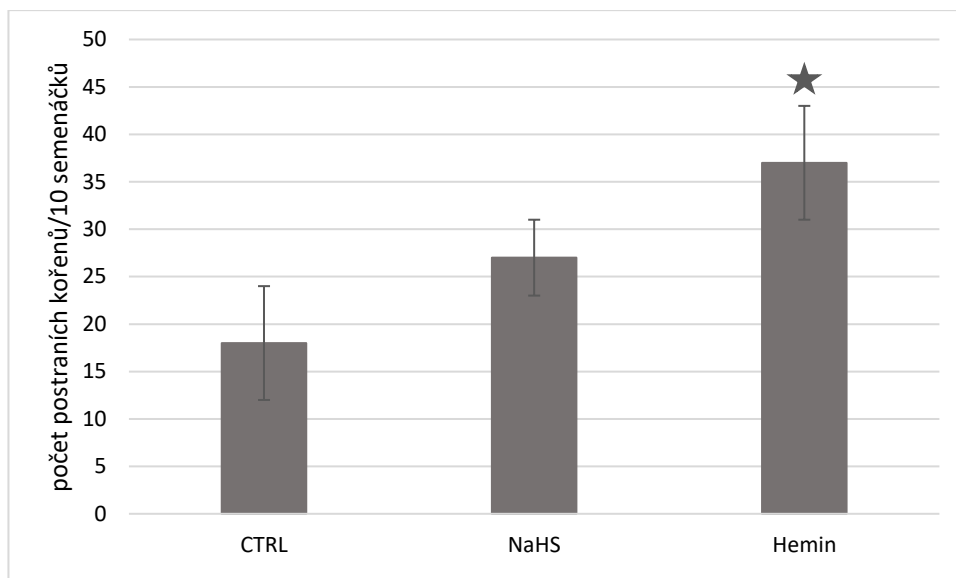
Obr. 24 Stanovení BV v kořenech 3-denních semenáčků inkubovaných po dobu 6 hodin s deionizovanou vodou (CTRL), 1 mM NaHS a 0,5 mM heminem. Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

4.3.3 Vývoj kořenového systému

Po 7 dnech byl u semenáčků vyhodnocen počet postranních kořenů (Obr. 25). Nejvýraznější vliv na vývoj postranních kořenů měla aplikace heminu, která vedla k tvorbě zvýšeného počtu postranních kořenů, zatímco v případě aplikací NaHS bylo zaznamenáno nevýznamné zvýšení počtu postranních kořenů ve srovnání s kontrolní skupinou (Obr. 26).



Obr. 25 Vývoj kořenového systému semenáčků po 7-denní inkubaci s 1 mM NaHS a 0,5 mM heminem. A - kontrola (deionizovaná voda), B - 1 mM NaHS, C - 0,5 mM hemin.



Obr. 26 Počet postranních kořenů semenáčků rajčete inkubovaných s 1 mM NaHS nebo 0,5 mM heminem (kontrolní skupina byla inkubována v deionizované vodě). Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

4.4 Vliv abiotického stresu na vývoj kořenového systému, aktivitu hemoxygenasy a hladinu biliverdinu v semenáčcích rajčete

V této části práce se pracovalo se dvěma rozdílnými kultivary rajčete, a to *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom a *Solanum lycopersicum* cv. Amateur. Oba kultivary byly kultivovány po dobu 10 dní na agarových médiích s obsahem CdCl_2 v koncentracích 0, 50, 100, 200 a 500 μM . Po skončení doby kultivace byl u obou kultivarů sledován vliv CdCl_2 na vývoj kořenového systému a byla stanovena koncentrace proteinů, aktivita HO, koncentrace BV a peroxidace lipidů v kořenových a nadzemních částech semenáčků.

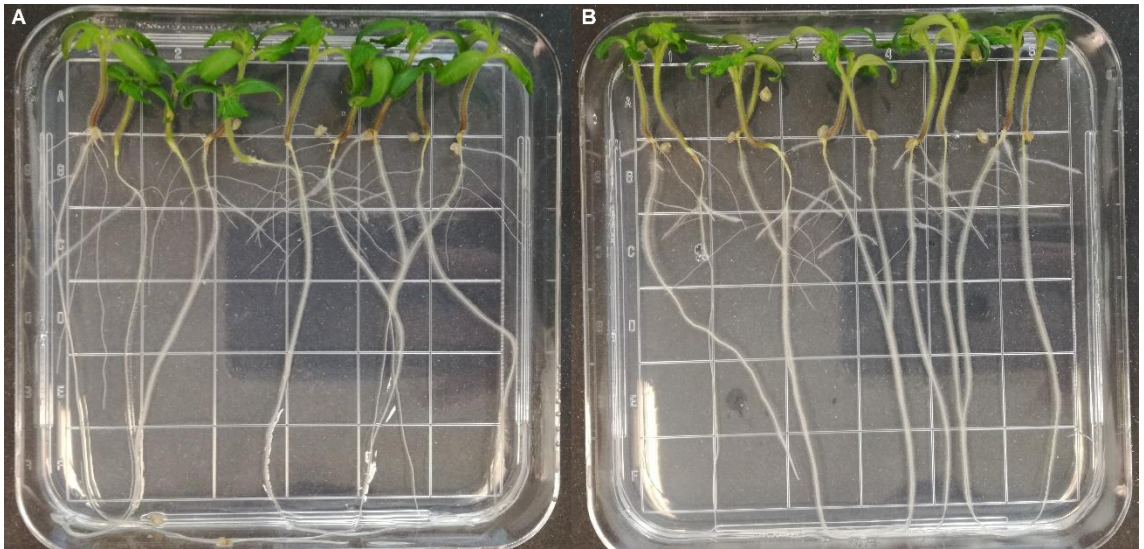
4.4.1 Vliv abiotického stresu na vývoj kořenového systému

Na fotografiích jsou zachyceny semenáčky *S. lycopersicum* cv. MicroTom po ukončení 10-ti denní kultivace na médiích bez CdCl_2 a s CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM (Obr. 27 - 30). Byly porovnány délky hlavních kořenů semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM (Obr. 35). Délky hlavních kořenů jednotlivých skupin semenáčků jsou srovnávány s délkou hlavních kořenů semenáčků kultivovaných na médiích bez obsahu CdCl_2 . Kořeny semenáčků kultivovaných na

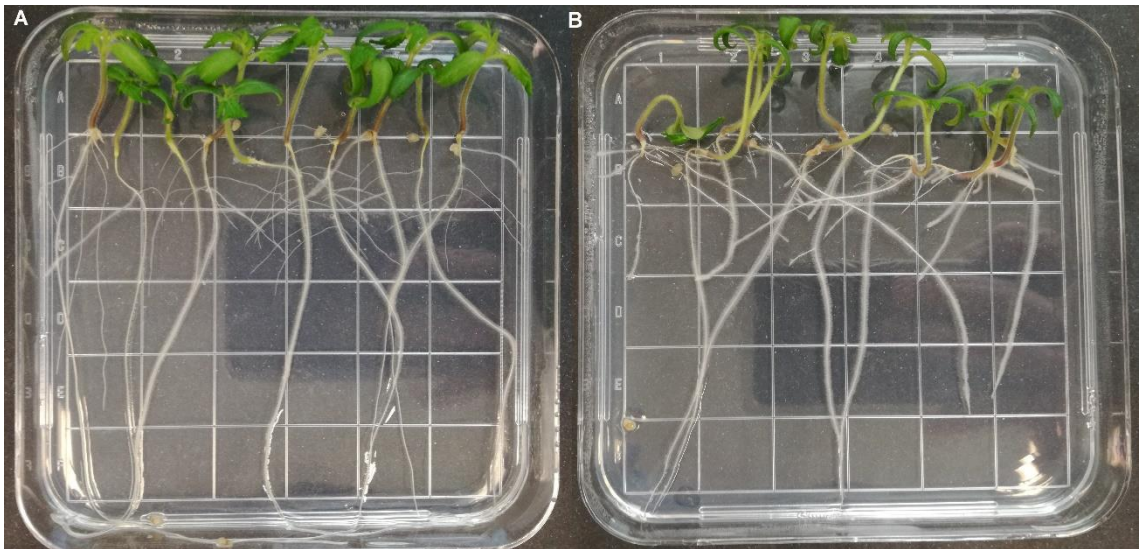
médiích s obsahem CdCl_2 o koncentraci $50 \mu\text{M}$ jsou delší než kořeny kontrolní skupiny semenáčků. V rámci kultivace na médiích s CdCl_2 v koncentracích od 50 po $500 \mu\text{M}$ byl zaznamenán pokles délky hlavních kořenů jednotlivých skupin semenáčků, kdy nejvýraznější byl zaznamenán u semenáčků kultivovaných na médiu s obsahem CdCl_2 o koncentraci $500 \mu\text{M}$. Délka kořenů se snížila na třetinu délky kořenů kontrolní skupiny. Délka hlavních kořenů semenáčků kultivovaných na médiu s obsahem CdCl_2 v koncentraci $100 \mu\text{M}$ se významně neliší od délky hlavních kořenů kontrolní skupiny semenáčků. U skupiny semenáčků kultivovaných na médiu s obsahem CdCl_2 v koncentraci $200 \mu\text{M}$ byl zaznamenán pokles délky hlavních kořenů oproti kontrolní skupině semenáčků.



Obr. 27 Vliv přidavku $50 \mu\text{M}$ CdCl_2 v agarovém médiu na vývoj 10-ti denních semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom. A - kontrola, B - $50 \mu\text{M}$ CdCl_2 .



Obr. 28 Vliv přidavku 100 μM CdCl_2 v agarovém médiu na vývoj 10-ti denních semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom. A - kontrola, B - 100 μM CdCl_2 .

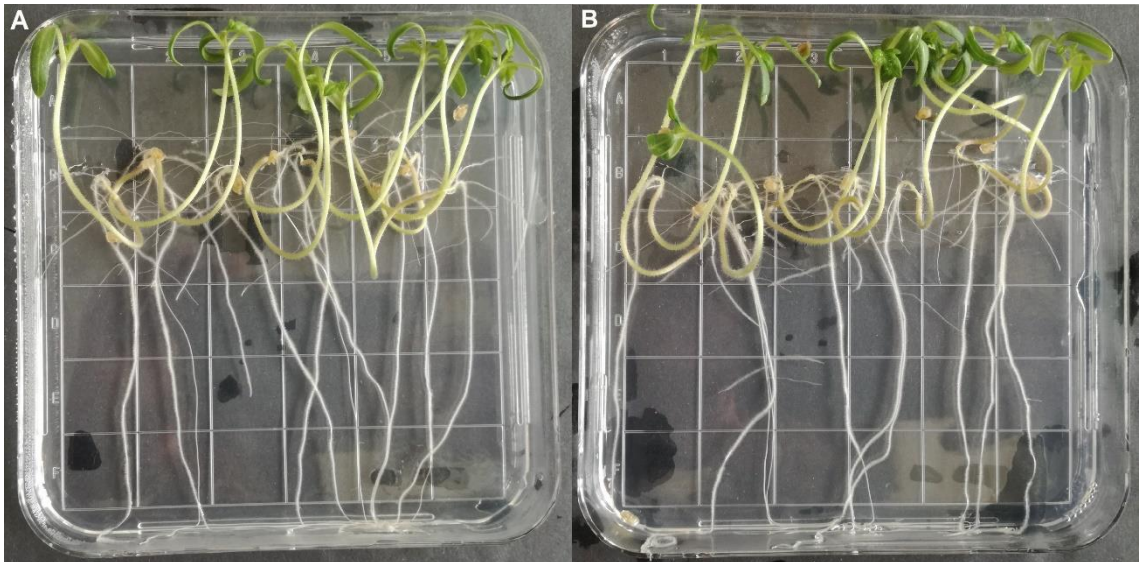


Obr. 29 Vliv přidavku 200 μM CdCl_2 v agarovém médiu na vývoj 10-ti denních semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom. A - kontrola, B - 200 μM CdCl_2 .

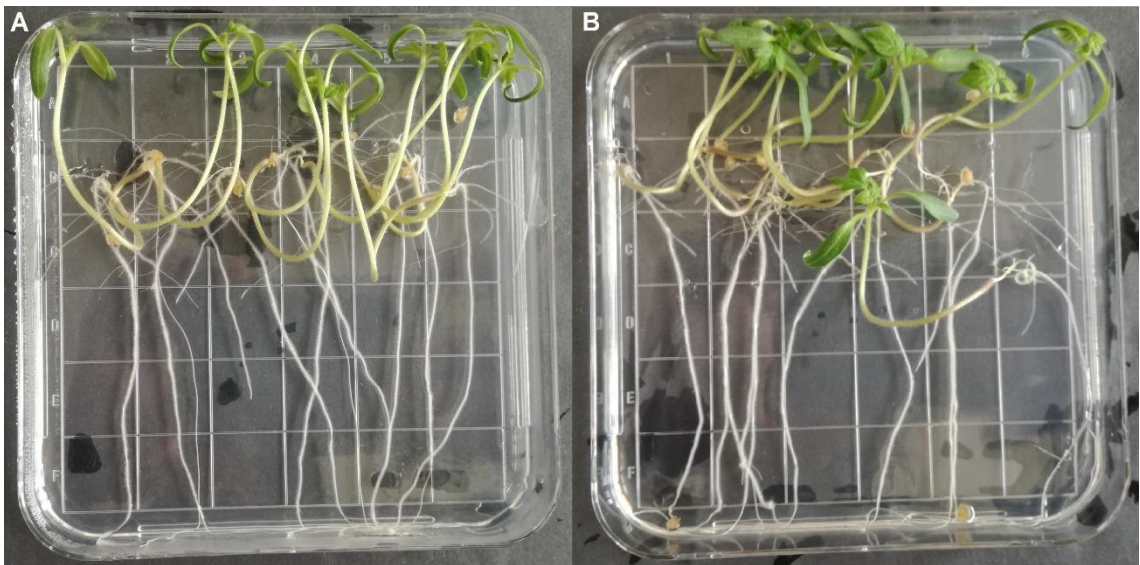


Obr. 30 Vliv přidavku $500 \mu\text{M CdCl}_2$ v agarovém médiu na vývoj 10-ti denních semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom. A - kontrola, B - $500 \mu\text{M CdCl}_2$.

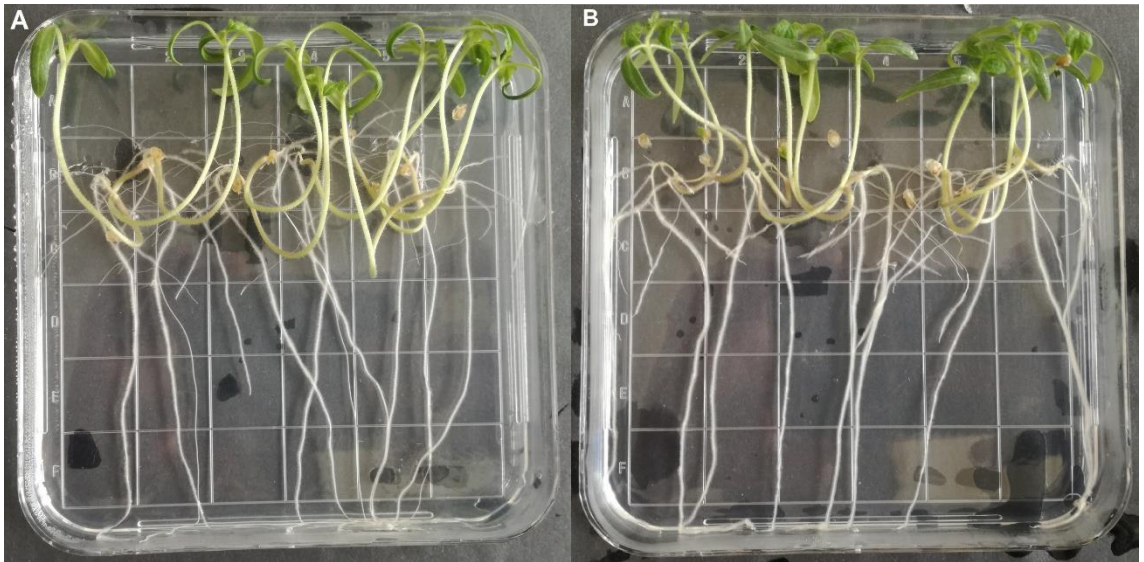
Na fotografiích jsou zachyceny semenáčky *S. lycopersicum* cv. Amateur po ukončení 10-ti denní kultivace na médiích bez CdCl_2 a s CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a $500 \mu\text{M}$ (Obr. 31 - 34). Byly porovnány délky hlavních kořenů semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a $500 \mu\text{M}$ (Obr. 35). Délky hlavních kořenů jednotlivých skupin semenáčků jsou srovnávány s délkou hlavních kořenů semenáčků kultivovaných na médiích bez obsahu CdCl_2 . Délka hlavních kořenů semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentracích 50, 100 a $200 \mu\text{M}$ se významně neliší od délky hlavních kořenů kontrolní skupiny semenáčků. Pokles délky hlavních kořenů vůči kontrolní skupině semenáčků byl zaznamenán pouze u skupiny semenáčků kultivovaných na médiu s obsahem CdCl_2 o koncentraci $500 \mu\text{M}$. Délka kořenů se snížila na méně jak polovinu délky kořenů kontrolní skupiny.



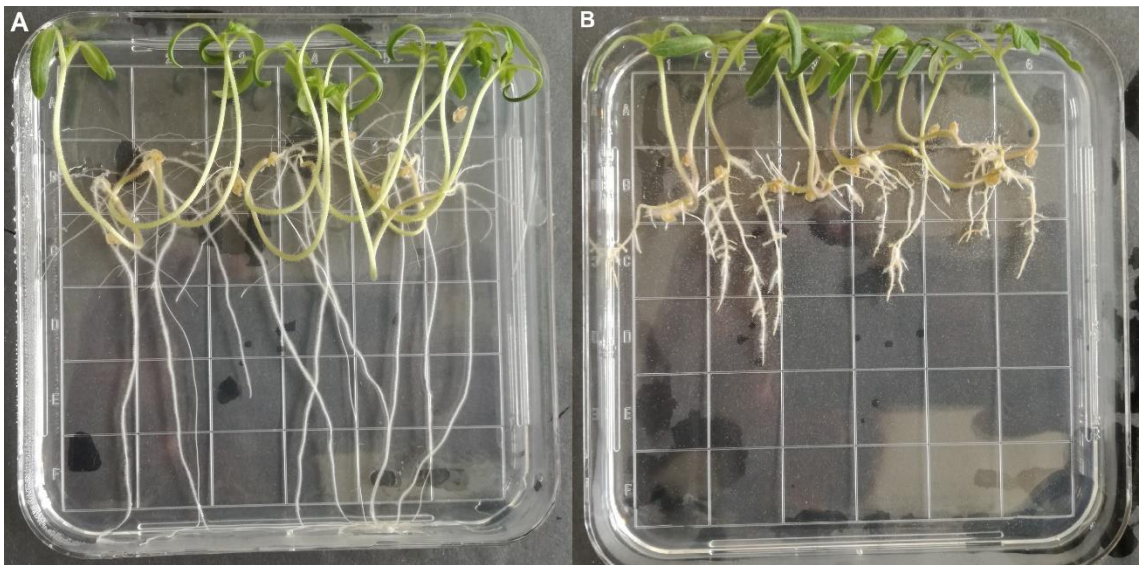
Obr. 31 Vliv přidavku 50 μM CdCl_2 v agarovém médiu na vývoj 10-ti denních semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur. A - kontrola, B - 50 μM CdCl_2 .



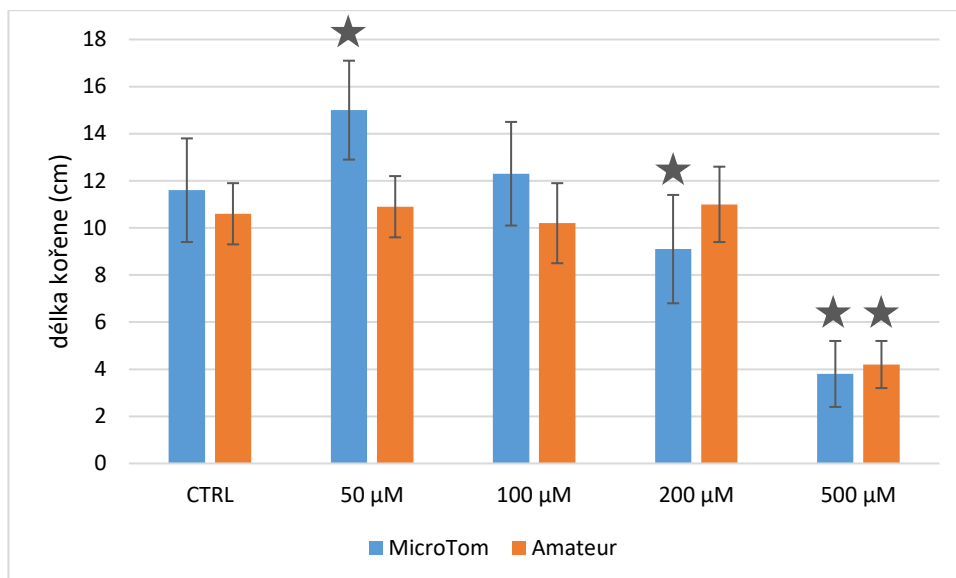
Obr. 32 Vliv přidavku 100 μM CdCl_2 v agarovém médiu na vývoj 10-ti denních semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur. A - kontrola, B - 100 μM CdCl_2 .



Obr. 33 Vliv přidavku 200 μM CdCl₂ v agarovém médiu na vývoj 10-ti denních semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur. A - kontrola, B - 200 μM CdCl₂.



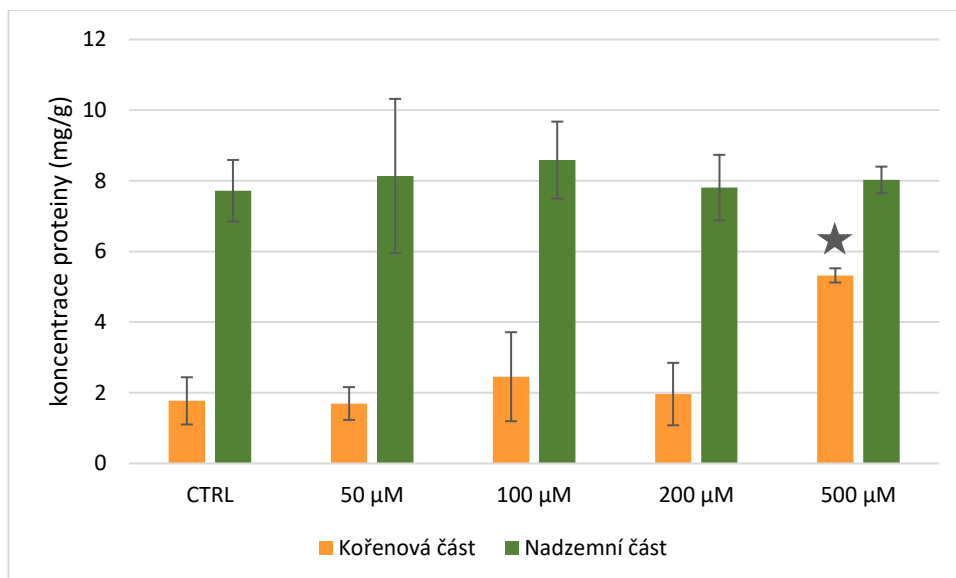
Obr. 34 Vliv přidavku 500 μM CdCl₂ v agarovém médiu na vývoj 10-ti denních semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur. A - kontrola, B - 500 μM CdCl₂.



Obr. 35 Délka hlavních kořenů semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom a cv. Amateur po 10-ti denní kultivaci na médiích bez CdCl_2 (CTRL) a s CdCl_2 v koncentraci 50, 100, 200 a 500 μM . Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*). Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05.

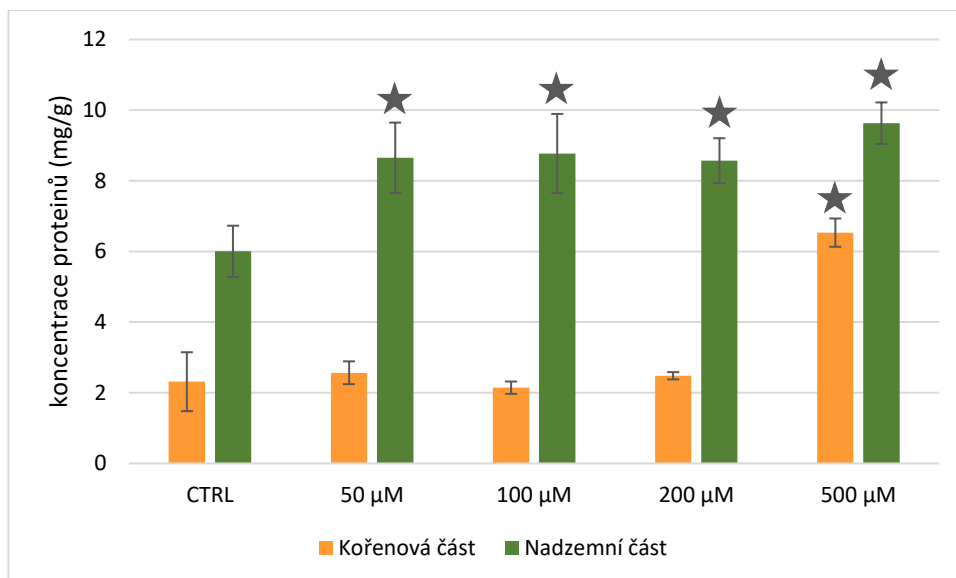
4.4.2 Vliv abiotického stresu na obsah proteinů

Ve vzorcích kořenové a nadzemní části semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM byl metodou Bradforda stanoven celkový obsah proteinů (Obr. 36). U vzorků kořenových částí došlo k významnému nárůstu obsahu proteinů vlivem kultivace na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentraci 500 μM . U dalších skupin vzorků kořenových částí nedošlo k významným změnám. U vzorků nadzemních částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 nebyly zaznamenány významné změny obsahu proteinů v porovnání s kontrolní skupinou.



Obr. 36 Obsah proteinů stanovený ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom po 10-ti denní kultivaci na médiích bez CdCl_2 (CTRL) a s CdCl_2 v koncentraci 50, 100, 200 a 500 μM . Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

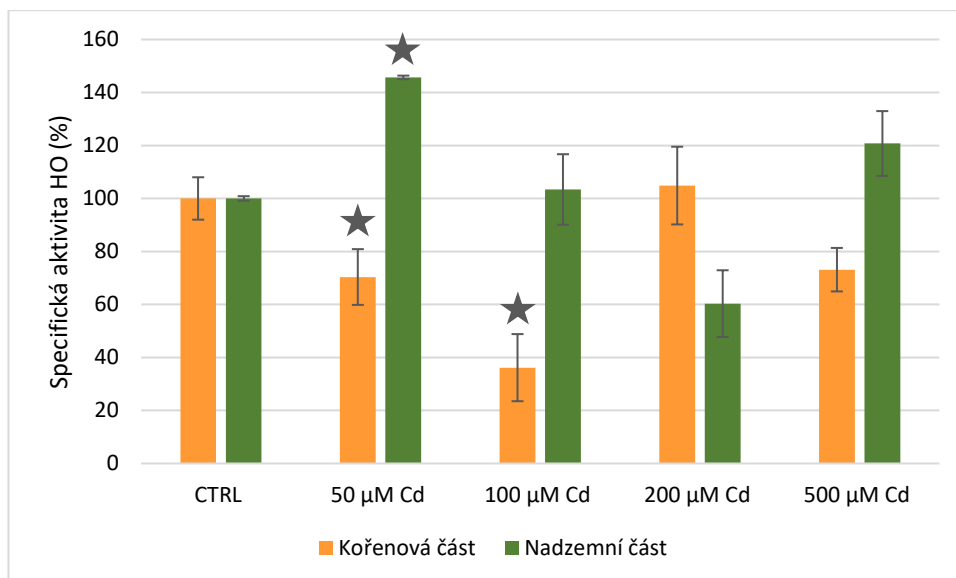
Obdobně byl stanoven obsah proteinů ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM (Obr. 37). U vzorků kořenových částí došlo k významnému nárůstu obsahu proteinů vlivem kultivace na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentraci 500 μM . U dalších skupin vzorků kořenových částí nedošlo k významným změnám. U vzorků nadzemních částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM byly zaznamenány vyšší koncentrace proteinů v porovnání s kontrolní skupinou.



Obr. 37 Obsah proteinů stanovený ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur po 10-ti denní kultivaci na médiích bez CdCl_2 (CTRL) a s CdCl_2 v koncentraci 50, 100, 200 a 500 μM . Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

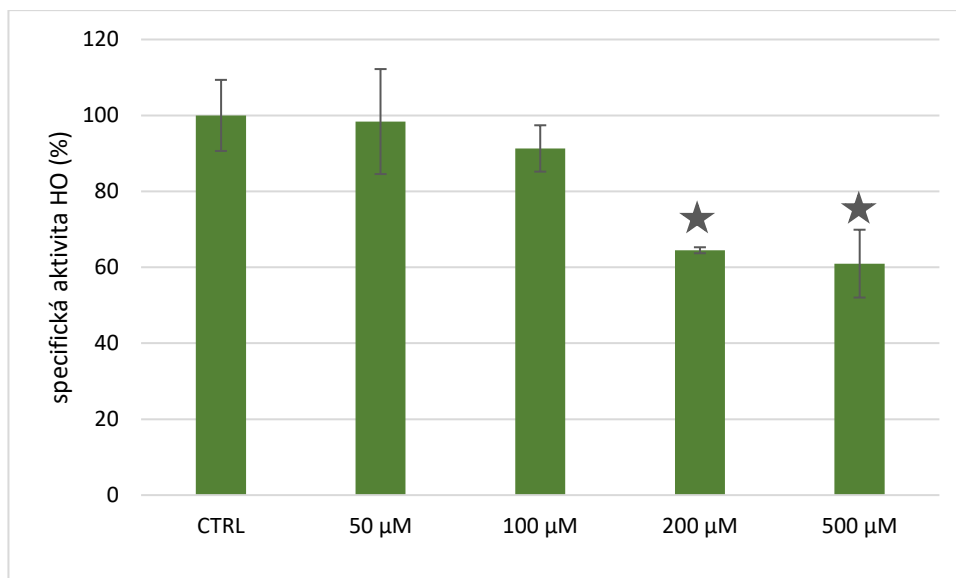
4.4.3 Vliv abiotického stresu na aktivitu hemoxygenasy

Ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM byla stanovena specifická aktivita HO (Obr. 38). U vzorků kořenových částí došlo k poklesu specifické aktivity HO vlivem kultivace na médiích s obsahem CdCl_2 . Pokles vůči kontrolní skupině nebyl zaznamenán pouze u vzorků z kořenových částí kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentraci 200 μM . U vzorků připravených z nadzemních částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem 50 a 500 μM CdCl_2 byl zaznamenán nárůst specifické aktivity HO v porovnání s kontrolní skupinou. Naopak u skupiny kultivované na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentraci 100 μM nebyly zaznamenány významné změny ve specifické aktivitě HO. U skupiny kultivované na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentraci 200 μM byl zaznamenán pokles specifické aktivity HO.



Obr. 38 Specifická aktivita HO stanovená ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom po 10-ti denní kultivaci na médiích bez CdCl_2 (CTRL) a s CdCl_2 v koncentraci 50, 100, 200 a 500 μM . Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

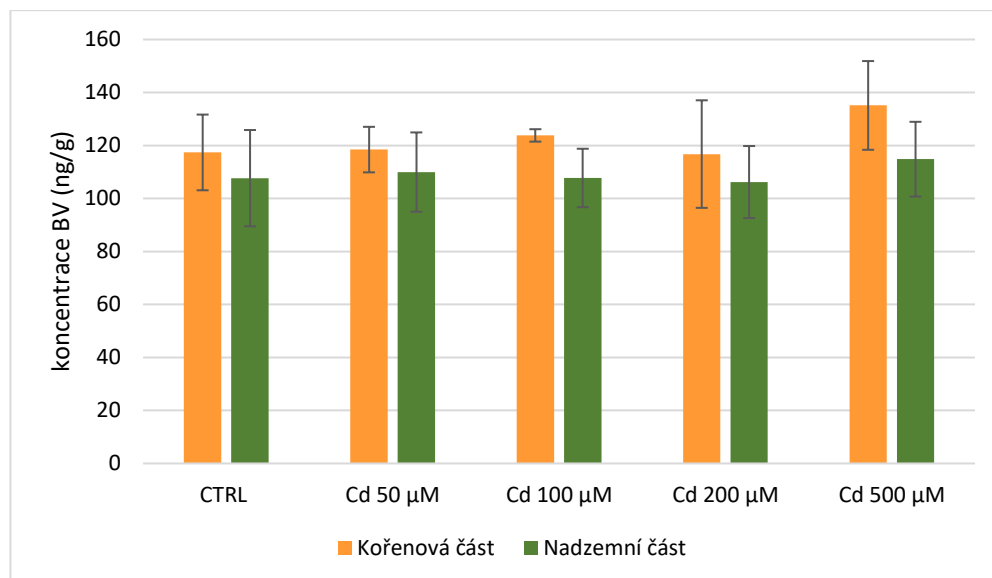
Ve vzorcích nadzemních části semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM byla stanovena specifická aktivita HO (Obr. 39). Výsledky specifické aktivity HO vzorků kořenových částí semenáčků nejsou uvedeny, jelikož aktivita HO byla v těchto vzorcích příliš nízká a zvolenou metodou ji nebylo možné měřit. U vzorků připravených z nadzemních částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem 50 a 100 μM CdCl_2 nebyly zaznamenány významné změny ve specifické aktivitě HO oproti kontrolní skupině. Významný pokles specifické aktivity HO byl zaznamenán u vzorků z nadzemních částí kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentraci 200 a 500 μM .



Obr. 39 Specifická aktivita HO stanovená ve vzorcích nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur po 10-ti denní kultivaci na médiích bez CdCl_2 (CTRL) a s CdCl_2 v koncentraci 50, 100, 200 a 500 μM . Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

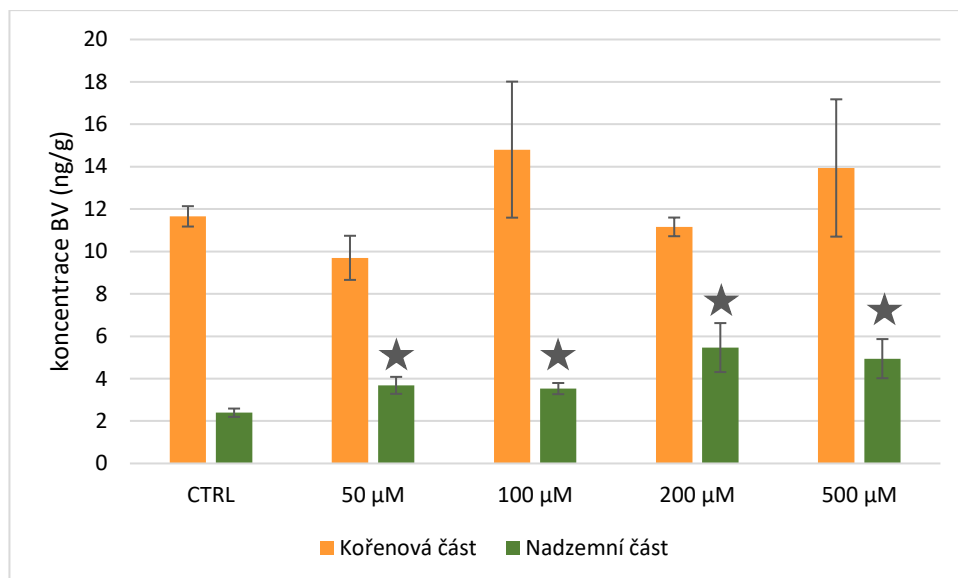
4.4.4 Vliv abiotického stresu na obsah biliverdinu

Obsah BV ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM (Obr. 40). Jak u vzorků kořenových částí, tak u vzorků nadzemních částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 nedošlo k významným změnám v porovnání s kontrolními skupinami.



Obr. 40 Obsah BV stanovený ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom po 10-ti denní kultivaci na médiích bez CdCl₂ (CTRL) a s CdCl₂ v koncentraci 50, 100, 200 a 500 μM. Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

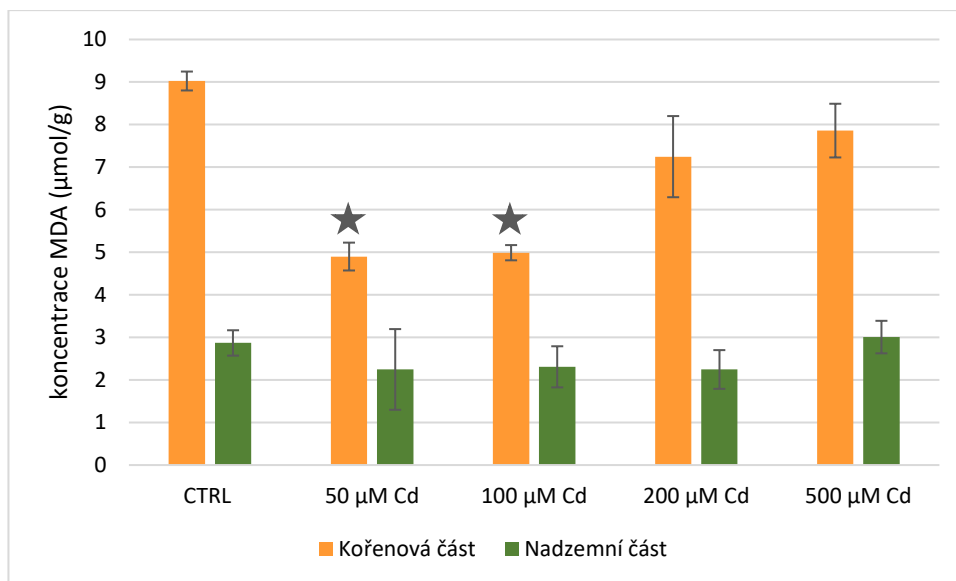
Obsah BV ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl₂ v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM (Obr. 41). U vzorků kořenových částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl₂ nedošlo k významným změnám v porovnání s kontrolní skupinou. Pro vzorky nadzemních částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl₂ bylo zaznamenáno mírné navýšení koncentrace BV v porovnání s kontrolní skupinou.



Obr. 41 Obsah BV stanovený ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur po 10-ti denní kultivaci na médiích bez CdCl_2 (CTRL) a s CdCl_2 v koncentraci 50, 100, 200 a 500 μM . Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

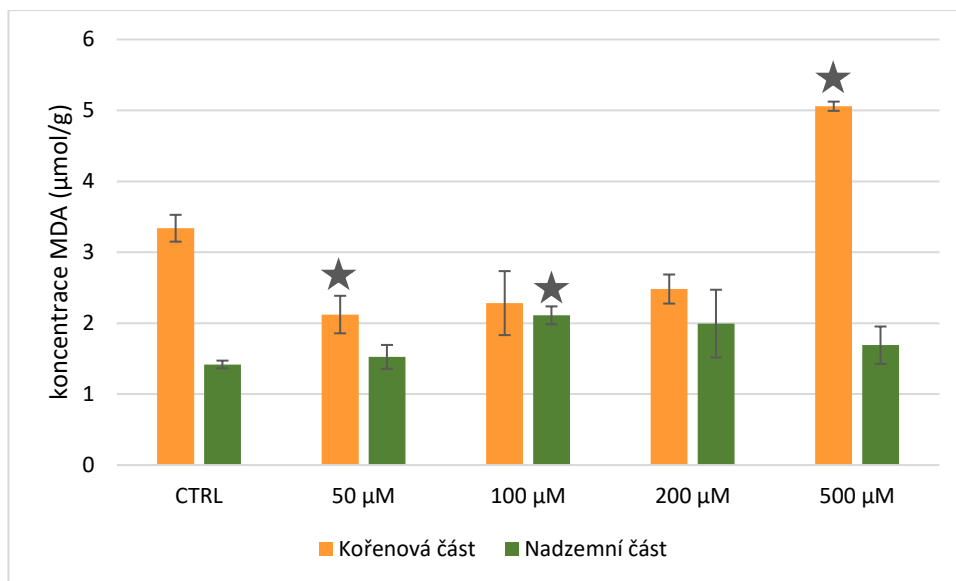
4.4.5 Vliv abiotického stresu na peroxidaci lipidů

Obsah malondialdehydu (MDA) ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl_2 v koncentracích 50, 100, 200 a 500 μM (Obr. 42). Pro vzorky kořenových částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 byl zaznamenán pokles koncentrace MDA v porovnání s kontrolní skupinou. V rámci skupin vzorků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentracích od 50 po 500 μM byl zaznamenán nárůst obsahu MDA. U vzorků připravených z nadzemních částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 nedošlo k významným změnám v porovnání s kontrolní skupinou.



Obr. 42 Obsah MDA stanovený ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom po 10-ti denní kultivaci na médiích bez CdCl₂ (CTRL) a s CdCl₂ v koncentraci 50, 100, 200 a 500 µM. Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

Obsah MDA ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur kultivovaných po dobu 10 dnů na médiích obsahující CdCl₂ v koncentracích 50; 100; 200 a 500 µM (Obr. 43). U vzorků kořenových částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl₂ v koncentracích 50, 100 a 200 µM byl zaznamenán pokles koncentrace MDA v porovnání s kontrolní skupinou. Pro skupinu vzorků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl₂ v koncentraci 500 µM byl zaznamenán významný nárůst koncentrace MDA v porovnání s kontrolní skupinou. Pro vzorky nadzemních částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl₂ bylo zaznamenáno mírné navýšení koncentrace MDA v porovnání s kontrolní skupinou.



Obr. 43 Obsah MDA stanovený ve vzorcích kořenových a nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur po 10-ti denní kultivaci na médiích bez CdCl_2 (CTRL) a s CdCl_2 v koncentraci 50, 100, 200 a 500 μM . Data byla statisticky vyhodnocena za využití t-testu na hladině významnosti 0,05. Skupiny s průměrnou hodnotou významně odlišnou od kontroly jsou označeny hvězdičkou (*).

5 DISKUZE

5.1 Stanovení interakce biliverdinu s RNS

Dosažené výsledky neodpovídají výsledkům uvedeným v literatuře Kaur *et al.*, 2003. Ta uvádí, že po přidavku DEA-NO došlo za 90 minut k úplnému poklesu koncentrace BV a v reakci s přidaným AS poklesla koncentrace BV na polovinu počáteční hodnoty. Odlišnost stanovených výsledků od výsledků uvedených v literatuře by mohla být důsledkem rozdílného reakčního prostředí pro reakci, které bylo v rámci stanovení použito. Kaur *et al.*, 2003 dle popsané metody v publikaci uvádí jako použité reakční prostředí Dulbeccovo médium modifikované dle Iscova. V rámci provedeného experimentu byl použit 25 mM HEPES pufr o pH 7,4, který je jednou z hlavních složek uvedeného média. Právě přítomnost dalších složek v modifikovaném Dulbeccovu médiu by mohla být faktorem zajišťující reakci mezi BV a RNS. V současnosti je publikace Kaur *et al.*, 2003 doposud jedinou publikací zabývající se interakcí mezi BV a RNS v podmínkách *in vitro*. V budoucnu by bylo vhodné testovat měření interakce BV s RNS za využití stejného reakčního prostředí jako uvádí literatura.

V rámci experimentu se použité donory RNS liší typem molekul, které uvolňují. SNP je donorem NO^+ , AS uvolňuje NO^- , DEA-NO je zdrojem NO a SNAP uvolňuje současně NO a NO^+ . V literatuře se dále předpokládá význam BV jako „lapače“ RNS (Kaur *et al.*, 2003). Na základě provedeného experimentu byla prokázána reakce mezi BV a NO^- (nitroxylový anion), který byl uvolněn z AS. Nitroxyl má vysokou afinitu k thiolovým skupinám, metaloproteinům a kovovým atomům, z toho důvodu je považován za nebezpečnou molekulu pro živé organismy. NO^- snadno podléhá reakci s kyslíkem za vzniku další molekuly RNS, kterou je peroxynitrit (ONOO^-) (Smulik *et al.*, 2014). Předpokládáný princip interakce mezi NO^- a BV je takový, že dochází k tvorbě reakčního produktu, který již není tak reaktivní (Kaur *et al.*, 2003).

5.2 Analýza obsahu biliverdinu v rostlinném materiálu

5.2.1 Fluorimetrická kvantifikace biliverdinu

Důvodem testování metody fluorimetrické kvantifikace byla její nenáročnost na provedení a přístrojové vybavení. Experimentálně stanovený limit detekce zavedené metody fluorimetrické kvantifikace byl 2 nM, naproti tomu literatura uvádí limit detekce pro HPLC-DAD 6 nM a pro HPLC-TLS 1,2 nM (Martelanc *et al.*, 2016).

UHPLC-MS/MS metodou zavedou dále v rámci diplomové práce byl experimentálně stanoven limit detekce BV 17 pM.

Hodnota koeficientu determinace pro vyhodnocení experimentálních dat závislosti intenzity fluorescence na koncentraci BV metodou lineární regrese byla $R^2 = 0,9349$. To poukazuje na nelineární charakter závislosti v širokém koncentračním rozmezí BV. Mírně lepšího výsledku bylo dosaženo lineární regrese zlogaritmovaných dat, kdy byla získána hodnota koeficientu determinace $R^2 = 0,9436$. Pro experimentální data závislosti intenzity fluorescence na koncentraci BV v reálném vzorku byla metodou lineární regrese stanovena hodnota koeficientu determinace $R^2 = 0,7144$.

Z pohledu přesnosti a opakovatelnosti metody může být problémem přítomnost dvou organických rozpouštědel v reakční směsi. Pro měření byla odebírána pouze methanolvá fáze, ale je možné, že došlo k její kontaminaci fází chloroformovou, která měla vliv na měřený fluorescenční signál. Měření rostlinného vzorku s přidavkem standardu BV bylo pravděpodobně negativně ovlivněno obsahem vody, kterou vzorek obsahoval. Vzorek byl připravován homogenizací v tekutém dusíku, tudíž nebyl zbaven vodné fáze. V literatuře je kladen důraz na zamezení přenosu vodné fáze extraktu do reakční směsi, jelikož je následně snížen fluorescenční signál (Gardikas *et al.*, 1950). Vhodným způsobem přípravy vzorku pro tuto metodu by tedy mohla být lyofilizace, která by vzorek zbavila vodné složky. Příprava vzorku lyofilizací se ukázala jako vhodná metoda přípravy vzorku pro metodu UHPLC-MS/MS analýzy BV, která byla v rámci diplomové práce zavedena. Pro tato tvrzení je potřeba dalšího výzkumu, ale jelikož je koncentrace BV v rostlinných vzorcích nižší než limit detekce zvolené metody, je metoda fluorimetrické kvantifikace BV pro stanovení BV v rostlinných vzorcích nevhodná.

5.2.2 Vývoj a optimalizace metody UHPLC-MS/MS analýzy biliverdinu

V rámci vývoje a optimalizace metody UHPLC analýzy BV bylo potřeba vyřešit problémy týkající se ulpívání BV na koloně a kovových částech systému. Dále byla velká pozornost věnována výběru a nastavení citlivé detekce BV v důsledku nízkého obsahu BV v rostlinných vzorcích.

Důvodem výběru hydrogenuhličitanu amonného místo acetátu amonného jako složky mobilní fáze byla nutnost disociace obou karboxylových skupin ve struktuře BV, čímž byla zajištěna jeho lepší rozpustnost. Hodnoty pK_A karboxylů BV jsou 3,9 a 5,3 (Lightner *et al.*, 1996). Pufrovaná oblast pH, kterou zvolený pufr zajišťuje, by měla vždy být $pK \pm 1$. V případě BV je vhodné zvolit oblast pH 4,3 - 6,3. Hydrogenuhličitan amonný pufruje oblast pH 5,4 - 7,4, zatímco acetát amonný pufruje oblast pH 3,6 - 5,6. Na základě pufrovaných oblastí pH je patrné, že hydrogenuhličitan amonný zajistí vyšší pH, které zajistí jistou disociaci obou karboxylových skupin BV.

V rámci zamezení záchytu BV na koloně byla dále zavedena gradientová eluce. Jako organická složka mobilní fáze byl testován methanol a acetonitril. Při použití kolony se stacionární fází na bázi silikagelu je eluční síla methanolu 0,73 a eluční síla acetonitrilu 0,5 (Klouda, 2003). Použitím methanolu, který má vyšší eluční sílu než acetonitril, bylo podstatně více zamezeno záchytu molekul BV na koloně a následnému přenosu BV do dalších analýz. Výhodou využití acetonitrilu jako druhé složky mobilní fáze byla kratší doba analýzy. Při teplotě 25°C má methanol viskozitu 0,553 mPa·s a acetonitril 0,343 mPa·s (Mikulčák *et al.*, 2013). Z těchto údajů je patrné, že methanol při průchodu HPLC systémem klade větší odpor a je nutné vyvinout podstatně vyššího tlaku v systému, aby bylo dosaženo stejné průtokové rychlosti pro obě organická rozpouštědla. Použití acetonitrilu umožnilo navýšení průtokové rychlosti na 0,3 ml/min a to z toho důvodu, že tlak v UHPLC systému nebyl tak vysoký, jako za využití methanolu při této průtokové rychlosti. Další výhodou acetonitrilu je kvalitnější rozdělení molekul vzorku, v chromatografickém píku bylo možné odlišit nečistoty od BV. Nevýhodou využití methanolu, jako druhé složky mobilní fáze, je nemožnost odlišit nečistoty od BV a delší doba analýzy. Analýza se prodloužila kvůli nutnosti snížení průtokové rychlosti na 0,2 ml/min z toho důvodu, že by tlak v UHPLC systému byl při vyšší průtokové rychlosti příliš vysoký a hrozilo by poškození kolony. Snížením průtokové rychlosti se prodloužila doba analýzy na 12 minut s retenčním časem BV 6,5 minuty.

Z analýz provedených s rostlinnými vzorky bylo zjištěno, že koncentrace BV je nižší než je limit detekce DAD. Literatura Martelanc *et al.*, 2016 uvádí, že limit detekce DAD je 6 nM. Z tohoto důvodu byl k UHPLC systému připojen hmotnostní spektrometr. Detekce tandemovou hmotnostní spektrometrií vykazovala vyšší citlivost, současně byl odstraněn problém výskytu nečistot ve standardu BV a použitím nižších koncentrací BV

bylo zcela zamezeno přenosu BV mezi analýzami. Pro tandemovou hmotnostní spektrometrii bylo potřeba v důsledku nízké fragmentace BV při nižších napětích nastavit napětí v kolizní cele na 40 V. To poukazuje na stabilitu molekuly BV. V důsledku nízké fragmentace mateřského iontu BV by signál jeho detekovaného fragmentu mohl být nízký, což by se negativně projevilo na stanovených koncentracích BV. Při tandemové hmotnostní spektrometrii je vhodné po fragmentaci mateřského iontu detekovat jeho dva nejvíce zastoupené fragmenty. V případě BV je ale čteně zastoupen pouze jediný fragment o m/z 297.

Provedení kalibrací standardu BV UHPLC-MS/MS metodou za využití methanolu nebo acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze vedlo k použití methanolu jako organické složky mobilní fáze. Kalibrace je hodnocena metodou lineární regrese dle hodnoty koeficientu determinace R^2 . Pro LC-MS/MS metody by kalibrace měly mít alespoň $R^2 = 0,999$. Použití methanolu zajišťuje lepší kalibraci metody s využitím standardu BV, jelikož $R^2 = 0,9995$. Využitím acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze nebylo dosaženo tohoto parametru a $R^2 = 0,9866$. Důvod vyšší hodnoty R^2 při použití methanolu je takový, že methanol, oproti acetonitrilu, méně potlačuje ionizaci molekul vzorku, protože je těkavější, snadno se odpařuje a pouze v malém množství se ionizuje. Teplota varu methanolu je 65°C , zatímco teplota varu acetonitrilu je 82°C (Mikulčák *et al.*, 2013).

V rámci optimalizace UHPLC-MS/MS metody pro stanovení BV bylo testováno její využití pro rostlinné vzorky, přičemž se metoda prokázala jako vhodná. Zavedená UHPLC-MS/MS metoda je první citlivou metodou vhodnou pro stanovení BV v rostlinných vzorcích v nM rozsahu koncentrací. V rámci kalibrace byly zavedenou metodou detekovány koncentrace standardu BV v rozsahu pM. V budoucnu se nabízí validace zavedené UHPLC-MS/MS metody.

5.2.3 Kalibrace UHPLC-MS/MS metody za využití interního standardu biliverdinu-d₄

Interní standard BV-d₄ je využíván z toho důvodu, že se jedná o standard BV značený stabilním izotopem vodíku deuteriem, který se v rámci zvolených analytických metod chová stejným způsobem jako neznačený standard BV a současně není přirozenou složkou komerčního neznačeného standardu BV ani biologických vzorků. Na základě

toho lze pomocí interního značeného standardu odhalit nedostatky zavedených metod, kterými jsou např. potlačení ionizace vzorku, ztráty analytu během přípravy vzorku nebo degradace vzorku během analýzy (Iwamori *et al.*, 2015). V rámci práce byla z časových důvodů provedena pouze kalibrace zavedené UHPLC-MS/MS metody za využití BV-d₄. Pro kalibrační přímku získanou lineární regresí logaritmovaných dat byla stanovena hodnota koeficientu determinace $R^2 = 0,9994$. V budoucnu by bylo vhodné využít měření s interním standardem pro vzorky kořenových a nadzemních částí rostlin. V případě nadzemních částí by za využití interního standardu mohlo být testováno potlačení ionizace BV obsahem chlorofylu ve vzorku. Literatura uvádí, že přítomnost chlorofylu ve vzorcích značně potlačuje ionizaci ostatních analytů (Ikonomou *et al.*, 1991). Současně by se mohly odhalit ztráty BV při přípravě vzorků. Dále by bylo vhodné využít interní standard BV-d₄ k validaci zavedené UHPL-MS/MS metody.

5.2.4 Stabilita biliverdinu

Nárůst koncentrace BV v průběhu experimentu u vzorků uchovávaných v mrazícím boxu a lednici je možno vysvětlit možným zakoncentrováním vzorků, ke kterému mohlo dojít v důsledku odpařování rozpouštědla methanolu. Vialky, ve kterých byly roztoky BV uchovávány, nebyly hermeticky uzavřené, tudíž páry methanolu mohly z vialek v průběhu experimentu unikat.

Dosažené výsledky naznačují, že hlavní vliv na degradaci BV má teplota prostředí. U vzorků uchovávaných při laboratorní teplotě ve tmě a za přístupu světla nebyl zaznamenán rozdíl v degradaci BV v důsledku fotooxidace. Pokud by měla fotooxidace BV výrazný vliv na jeho degradaci, vzorek uchovávaný za přístupu světla by byl rychleji degradován. Současně je nutno zdůraznit, že všechny roztoky BV obsahovaly kyslík, který způsobuje oxidaci BV. Na základě výsledků lze hodnotit, že uchovávání vzorků v mrazu a chladu zpomaluje degradaci BV v důsledku jeho oxidace. Oxidaci BV v důsledku přítomnosti kyslíku ve vzorku lze snížit probubláváním roztoků inertním plynem. Výrobce standardu BV doporučuje jako vhodný způsob uchovávání skladování při teplotě -20°C (Sigma-Aldrich). Z provedeného experimentu plyne, že vzorky standardu BV připravené ke stanovení je vhodné uchovávat v mrazícím boxu, kde jsou stabilní po dobu 14 dní. Současně by při časově delších analýzách měl postačit k zajištění stability vzorků standardu BV vychlazený zásobník vzorků HPLC systému na 4°C. Tento

experiment se zabýval pouze stabilitou vzorků standardu BV. V budoucnu by bylo vhodné provést obdobný experiment pro vzorky připravené z rostlinného materiálu, jelikož stabilita BV v rostlinných vzorcích může být ovlivněna přítomností dalších látek ve vzorku.

5.2.5 Vliv přípravy vzorku na obsah biliverdinu

Předpokládá se, že naměřené přibližně stejné množství BV při obou způsobech přípravy vzorků z nadzemních částí je důsledkem vysokého obsahu chlorofylu ve vzorku připraveném lyofilizací, jelikož obsah chlorofylu ve vzorku značně potlačuje ionizaci jiných molekul (Ikonomou *et al.*, 1991).

Nevýhodou lyofilizace je potřeba výrazně většího množství čerstvého rostlinného materiálu než u přípravy vzorku homogenizací v tekutém dusíku. Použité 14-ti denní semenáčky mají malou kořenovou část a pro získání potřebného množství čerstvého rostlinného materiálu bylo potřeba přibližně 150 kusů semenáčků. Naproti tomu pro přípravu vzorku homogenizací v tekutém dusíku bylo potřeba přibližně 30 kusů semenáčků. Z těchto důvodů byla homogenizace v tekutém dusíku vybrána jako hlavní způsob přípravy vzorků pro stanovení obsahu BV v následných experimentech této práce.

5.3 Vliv induktorů hemoxygenasy na aktivitu hemoxygenasy, hladiny biliverdinu a vývoj kořenového systému semenáčků rajčete

Na základě dříve publikovaných studií se předpokládalo, že aplikace NaHS a heminu vyvolá nárůst aktivity HO a zvýšenou tvorbu postranních kořenů. Hemin je substrátem pro enzym HO a bylo popsáno, že aplikace heminu v koncentraci 0,2 mM vyvolá již po 6 hodinách zvýšenou expresi genu HO u sazenic rajčat (Fang *et al.* 2014). Indukce aktivity HO působením heminu je popsána i v dalších studiích, kde jsou aplikovány jeho rozdílné koncentrace (1 a 10 μM) na různé rostlinné druhy jako jsou brukvovité rostliny, *Arabidopsis thaliana*, rýže nebo okurka (Xuan *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Obdobně je HO významně zapojena do tvorby postranních kořenů (Shekhawat a Verma, 2010). Zapojení HO do tvorby postranních kořenů spočívá v produkci CO, který je jedním z produktů degradace hemu, kterou HO katalyzuje. Molekula CO působí jako plynná signální molekula aktivující dráhy vedoucí ke tvorbě postranních kořenů (Fang *et al.* 2014).

NaHS je donorem H₂S, která se v rostlinách vyskytuje přirozeně a působí jako signální molekula při spuštění obranných odpovědí na stresové faktory. H₂S může indukovat tvorbu postranních kořenů, protože se jako signální molekula účastní modulace exprese regulačních genů buněčného cyklu, což vede ke zvýšení exprese genu HO, konkrétně izoformy HO1 (Zhang *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2012; Fang *et al.* 2014).

Předpoklad vlivu vedoucího ke zvýšení aktivity HO byl potvrzen u semenáčků po 6-hodinové inkubaci s 0,5 mM roztokem heminu, Ve srovnání s kontrolní skupinou semenáčků došlo k výraznému vývoji postranních kořenů a specifická aktivita HO vzrostla dvojnásobně. Současně bylo pozorováno i dvojnásobné zvýšení koncentrace BV jako specifického produktu reakce katalyzované HO. Dosažené výsledky potvrzují vliv heminu na aktivitu HO a tvorbu postranních kořenů, tak jako uvádí literatura Fang *et al.*, 2014. Současně byly optimalizovanou metodou UHPLC-MS/MS stanoveny změny koncentrace BV v důsledku indukce aktivity HO. Jednalo se o vůbec první stanovení endogenní koncentrace BV v rámci podobných experimentů s rostlinnými vzorky.

Ve srovnání s aplikací heminu neměla oproti předpokladům aplikace 1 mM NaHS očekávané účinky: ve srovnání s kontrolní skupinou semenáčků došlo jen k nevýznamné mírně zvýšené tvorbě postranních kořenů, a ani specifická aktivita HO a koncentrace BV se oproti kontrolní skupině významně nezměnila. Literatura Fang *et al.*, 2014 uvádí, že aktivita HO vzroste již 3 hodiny po aplikaci látky a v čase 6 hodin je zaznamenán její nejvyšší nárůst. Tyto výsledky ale nepotvrzují vliv NaHS na aktivitu HO a tvorbu postranních kořenů. Provedený experiment se od experimentu uvedeném v publikaci Fang *et al.*, 2014 liší v použitém kultivaru rajčete. Pro provedení experimentu byl použit kultivar MicroTom, zatímco publikace uvádí jako použitý kultivar Jiangshu 14 (Fang *et al.*, 2014). Průběh experimentů byl v obou případech stejný, na semenáčky rajčat byly aplikovány roztoky NaHS v 1 mM koncentraci po dobu 6 hodin. V rámci provedeného experimentu nelze vyloučit možnost, že se vliv NaHS projevil dříve než po 6 hodinách od aplikace a po 6 hodinové inkubaci byl již zaznamenán pokles aktivity zpět na původní hladinu. Tento předpoklad by se ale projevil zvýšeným obsahem BV, což se na základě stanovení BV nepotvrdilo. Přesto ale nelze zcela vyloučit, že nadbytek vzniklého BV byl transportován dosud neobjevenými transportéry do nadzemních částí semenáčků, ve kterých aktivita HO a obsah BV nebyly stanoveny. Dalším odůvodněním pro tento výsledek může být fakt, že roztok NaHS je nestabilní a po jeho aplikaci může dojít k

rychlému rozkladu. Roztok NaHS je plynule rozkládán na plynný H₂S, rychlost rozkladu je ovlivněna hodnotou pH rozpouštědla a teplotou okolního prostředí. Jako rozpouštědlo pevného NaHS byla použita deionizovaná voda, jejíž pH spadá do kyselé oblasti (5,5 - 7). Literatura uvádí, že pro zamezení uvolňování plynného H₂S by mělo být pH použitého rozpouštědla větší jak 10. Současně uvádí, že při pH = 7 se uvolní až 80 % plynného H₂S. Vlivem vzrůstající teploty dochází k rychlejšímu rozkladu roztoku NaHS (Pubchem). Právě v důsledku rychlého rozkladu roztoku NaHS mohlo dojít ke vzniku pouze malého množství H₂S, které nevyvolalo dostatečnou odpověď.

5.4 Vliv abiotického stresu na vývoj kořenového systému, aktivitu hemoxygenasy a hladinu biliverdinu v semenáčcích rajčete

Kadmium (Cd) je toxický kov. Hlavním z důvodů toxicity Cd je jeho vysoká afinita k thiolovým skupinám, které jsou významnými skupinami enzymů, peptidů a proteinů. Naváže-li se Cd na thiolovou skupinu enzymu, dojde často k nevratné inaktivaci enzymu, což je pro organismus nežádoucí. Současně je Cd v živých organismech vázáno na tripeptid glutathion, který se účastní významných reakcí katalyzovaných antioxidantními enzymy. Vazbou Cd na glutathion je snížena koncentrace glutathionu v organismu a dochází tak k narušení redoxní rovnováhy za vzniku oxidativního prostředí způsobeného tvorbou ROS, které by za normálních podmínek glutathion redukoval (Cuypers *et al.*, 2010). I přesto, že se nejedná o esenciální prvek, je velmi snadno rostlinami přijímán, a to v důsledku flexibility iontových kanálů a kovových transportérů (Liu *et al.*, 2003). Akumulace Cd způsobuje mnoho buněčných změn, dochází k inhibici enzymů, což může vést k poruchám fotosyntézy, čímž je značně narušen celý buněčný metabolismus. Další změny se týkají propustnosti cytoplazmatické membrány nebo buněčného cyklu (Hasan *et al.*, 2015). Vystavení rostlin nebezpečné chemické látky se označuje jako abiotický stres. Různé typy abiotického stresu často vyvolávají stres oxidační, během kterého dochází k výrazné nadprodukci ROS a RNS v buňkách rostlin. Zvýšené koncentrace molekul ROS a RNS musí být sníženy, aby nedošlo k narušení buněčných struktur nebo buněčné smrti. Předpokládá se, že do enzymové obrany proti oxidačnímu stresu v buňkách rostlin je zapojen také enzym HO. HO nekatalyzuje přímou přeměnu ROS nebo RNS, tak jako jiné antioxidantní enzymy, ale předpokládá se, že se podílí na obranných reakcích nepřímou, a to prostřednictvím produktů degradace hemu, kterou HO katalyzuje (Shekhawat a Verma, 2010). V této práci je věnována pozornost BV, který je

jedním z degradačních produktů hemu a jsou u něj předpokládány antioxidační vlastnosti. Stanovení aktivity HO úzce souvisí se stanovením koncentrace BV. Pokud dojde ke zvýšení nebo snížení aktivity HO, může to vést ke zvýšené nebo snížené koncentraci BV. Z toho důvodu, byla u rostlinných vzorků stanovována jak koncentrace BV, tak i aktivita HO.

Pojem peroxidace lipidů se týká polynenasycených mastných kyselin (PUFA), které se v rostlinných buňkách vyskytují v cytoplazmatické membráně a membránách buněčných organel. Peroxidaci lipidů lze rozdělit na enzymovou a neenzymovou. Enzymová peroxidace je katalyzována skupinou enzymů lipoxygenas (Kühn a Thiele, 1999). V případě neenzymové peroxidace lipidů je oxidace PUFA vyvolána volnými radikály. Působení volných radikálů vyvolá řetězovou reakci, během které je oxidováno velké množství PUFA (Shah *et al.*, 2001). Během peroxidace lipidů vzniká jako jeden z koncových sekundárních produktů molekula malondialdehydu (MDA), která má ze všech koncových produktů největší zastoupení. Z toho důvodu se stanovení koncentrace MDA využívá k hodnocení peroxidace lipidů (Hodges *et al.*, 1999). MDA je toxická molekula, která se ve struktuře proteinů váže na volné aminoskupiny, čímž mění vlastnosti proteinů. Současně je procesem peroxidace lipidů pozměněna tekutost a propustnost membrán, jelikož je narušen obsah PUFA (Shah *et al.*, 2001). Rostlinné buňky vystavené vyššímu oxidačnímu stresu obsahují vyšší koncentrace ROS a ty mohou snadno vyvolat řetězovou reakci oxidace PUFA.

Předpokládalo se, že vývoj kořenového systému, koncentrace proteinů, aktivita HO, koncentrace BV a peroxidace lipidů u semenáčků kultivovaných po dobu 10 dní na médiích s CdCl₂ by měla být výrazně ovlivněna právě přítomností Cd²⁺ kationtů, ale současně by mohla být ovlivněna i přítomností Cl⁻ aniontu, jehož zdrojem je taktéž CdCl₂. V kontrolním médiu bez CdCl₂ byl obsah Cl⁻ aniontu 3 mM (Duchefa). Přídavek CdCl₂ v rozsahu koncentrací 50 - 500 μM způsobí minimální změnu koncentrace Cl⁻ aniontu v používaných agarových médiích, tudíž lze možnost vlivu Cl⁻ aniontu zanedbat.

Na základě dosažených výsledků lze porovnat i odpovědi obou kultivarů *S. lycopersicum* cv. MicroTom a *S. lycopersicum* cv. Amateur na abiotický stres. Je známo, že kultivary se od sebe liší rezistencí vůči napadení patogenem, které se označuje jako biotický stres (Lebeda *et al.*, 2014). *S. lycopersicum* cv. MicroTom je středně

rezistentní vůči napadení patogenem *Pseudoidium neolyopersici*, zatímco *S. lycopersicum* cv. Amateur je vysoce náchylný k napadení patogenem *Pseudoidium neolyopersici*. Odolnost a obranné reakce vůči abiotickému stresu nebyly doposud pro oba kultivary vzájemně porovnány.

Kultivace semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom na médiích s obsahem CdCl_2 měla za následek významné změny ve vývoji a délce hlavního kořene. Literatura uvádí, že v důsledku aplikace vzrůstajících koncentrací Cd dochází ke zvyšování koncentrací melatoninu (Hasan *et al.*, 2015). Melatonin je signální molekula uplatňující se při signalizaci růstu a stresu v rostlinných buňkách. Významně se podílí na regulaci růstu kořenů a toleranci vůči abiotickému stresu (Hasan *et al.*, 2015). Při kultivaci na médiích s obsahem CdCl_2 v koncentraci 50 μM mohlo dojít k mírnému zvýšení hladiny melatoninu, která mohla aktivovat signalizaci vedoucí k proliferaci buněk kořenové části, což se projevilo nárůstem délky hlavního kořene vůči kontrolní skupině semenáčků. V rámci dalších skupin semenáčků byl zaznamenán pokles délky hlavního kořene jednoznačnou odpovědí na zvyšující se aplikované koncentrace CdCl_2 . Zvýšená hladina melatoninu, může prostřednictvím signálních drah aktivovat zvýšenou tvorbu buněčné stěny a vakuol, zatímco signalizace růstu může být omezena. Právě ukládání Cd do vakuol je jedním ze základních mechanismů snížení toxicity Cd v rostlinách (Hasan *et al.*, 2015). Na fotografiích na Obr. 30 je vidět výrazné ztloustnutí kořenové části oproti kontrolní skupině u semenáčků kultivovaných na médiu s obsahem CdCl_2 v koncentraci 500 μM . To může být způsobeno nadměrnou tvorbou buněčné stěny v důsledku vysoké koncentrace melatoninu vyvolané vysokou koncentrací CdCl_2 , která je pro semenáčky již toxická. Zároveň byly pozorovány změny ve vývoji nadzemních částí semenáčků vlivem kultivace na médiích s obsahem CdCl_2 . Z fotografií na Obr. 27 - 30 je patrné že vlivem CdCl_2 došlo k sníženému vývoji nadzemních částí oproti kontrolní skupině. Tento jev může být odůvodněn negativním vlivem vazby Cd na proteiny, kdy právě akumulace Cd má značný vliv na metabolismus rostliny v důsledku snížení aktivity enzymů fotosyntézy. Jedním z nich je i enzym RuBisCo aktivasa (RCA; EC 4.1.1.36). Vazbou Cd na RCA dochází ke snížení aktivity RCA, čímž se sníží asimilace CO_2 a je tak negativně ovlivněn celkový metabolismus sacharidů v rostlinách (DalCorso *et al.*, 2013).

Přídavek CdCl_2 do kultivačního média měl méně výrazný vliv na vývoj semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur oproti *S. lycopersicum* cv. MicroTom. *S. lycopersicum*

cv. Amateur během svého vývoje podstatně více toleroval obsah CdCl₂ v médiích, jelikož nebyly zaznamenány změny v délce hlavních kořenů oproti kontrolní skupině. Současně nebyly zaznamenány výrazné změny ve vývoji nadzemních částí semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl₂ oproti kontrolní skupině (Obr. 31 - 34). Je možné, že kultivace na médiích s obsahem CdCl₂ vedla ke zvýšení koncentrace melatoninu, která se zúčastnila signalizace vedoucí k obranným reakcím, v jejichž důsledku se semenáčky adaptovaly na abiotický stres během vývoje. Výjimku představovala pouze skupina semenáčků kultivovaná na médiích s obsahem CdCl₂ v koncentraci 500 μM. Ta je pro semenáčky již značně toxická a opět došlo k vyvolání obranné reakce, kterou je ztloustnutí kořenové části semenáčků. Tento jev mohl být důsledkem zvýšení koncentrace melatoninu, tak jako u *S. lycopersicum* cv. MicroTom. Pro další studia by bylo vhodné provést analýzy testující hladinu melatoninu ve vzorcích ze semenáčků obou kultivarů kultivovaných na médiích s obsahem CdCl₂.

Vliv CdCl₂ na obsah proteinů ve vzorcích kořenové části semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom a *S. lycopersicum* cv. Amateur byl pozorován pro koncentraci 500 μM CdCl₂ u obou kultivarů. U zbývajících skupin semenáčků obou použitých kultivarů kultivovaných s nižšími koncentracemi CdCl₂ nebyly zaznamenány významné změny v obsahu proteinů vůči kontrolním skupinám. To znamená, že Cd přijaté rostlinou mohlo být uloženo do vakuol v kořenové části nebo mohlo být transportováno proteinovými transportéry vázající kovové ionty do nadzemních částí rostliny. Přítomnost Cd v kořenové části mohlo mít vliv na změny v zastoupení proteinů, některé proteiny mohly být exprimovány více, jiné proteiny naopak méně. V důsledku aplikace 500 μM koncentrace CdCl₂ mohlo být Cd ukládáno nejen do vakuol, jako při aplikaci nižších koncentrací CdCl₂, ale současně mohly být vyvolány obranné reakce vedoucí ke zvýšené tvorbě antioxidantních enzymů, proteinů tepelného šoku (HSP) a speciálních proteinů vázajících Cd, tzv. akumulátorových proteinů. HSP je skupina proteinů podílejících se na obranné reakci vůči abiotickému stresu. Akumulátorové proteiny jsou proteiny, jejichž exprese je podpořena zvýšenou koncentrací těžkého kovu v rostlině. Jedná se o proteiny vázající těžký kov, čímž je zamezeno vazbě těžkého kovu na významné rostlinné proteiny. Příkladem skupiny akumulátorových proteinů jsou fytochelatiny, obsahující ve své struktuře opakující se motiv glutathionu - aminokyseliny glutamát, cystein a glycin, a právě na thiolové skupiny cysteinu se Cd váže (DalCorso *et al.*, 2013).

Vlivem kultivace na médiích s obsahem CdCl₂ došlo ke zvýšení obsahu proteinů vůči kontrolní skupině ve vzorcích nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur. Tento jev mohl být důsledkem akumulace Cd v semenáčcích, která spustila signální dráhu vedoucí k expresi akumulátorových proteinů, které vážou Cd. Jejich tvorbou bylo zabráněno vazbě Cd na jiné, pro rostlinu životně důležité proteiny. Z toho důvodu se nadzemní části semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur kultivovaných na médiích s obsahem CdCl₂ vyvíjely obdobně jako kontrolní skupina semenáčků. Současně mohly být ve zvýšeném množství exprimovány další proteiny podílející se na ochraně rostliny proti oxidačnímu stresu, a to celá řada antioxidantních enzymů a HSP. Naopak ve vzorcích nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom nebyly zaznamenány změny v obsahu proteinů vlivem kultivace na médiích s obsahem CdCl₂. To může znamenat, že akumulace Cd zde nevedla ke zvýšené expresi antioxidantních enzymů, HSP nebo akumulátorových proteinů, což mohlo být příčinou vazby Cd na významné rostlinné proteiny. Tato hypotéza je podpořena pozorováním zpomaleného vývoje nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom v důsledku kultivace na médiích s obsahem CdCl₂, kdy tento jev byl diskutován právě vazbou Cd na významné rostlinné proteiny.

U semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom výsledky stanovení specifické aktivity HO ve vzorcích jak kořenové, tak nadzemní části nevykazují žádný jednoznačný trend. Z toho důvodu byly dosažené výsledky diskutovány s výsledky stanovení koncentrace BV, jelikož BV je produktem degradace hemu, kterou HO katalyzuje. V rámci stanovení koncentrace BV nebyly zaznamenány významné změny vlivem kultivace na médiích s obsahem CdCl₂ oproti kontrolní skupině a současně ani v rámci jednotlivých skupin semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl₂. Tento výsledek byl zaznamenán pro vzorky kořenové i nadzemní části a je v souladu se zjištěním, že aktivita HO nebyla u kultivaru MicroTom významně ovlivněna kultivací na médiích s obsahem CdCl₂. Jedním z možných vysvětlení těchto výsledků je možná akumulace Cd do rostlinných částí, čímž by byla ovlivněna jejich hmotnost. V rámci všech stanovení aktivity HO byla navažována vždy stejná hmotnost rostlinného materiálu. V případě výrazné akumulace Cd by u stresovaných rostlin vzorky se stejnou hmotností odpovídaly menšímu množství rostlinného materiálu ve srovnání s kontrolními skupinami. Literatura uvádí množství akumulovaného Cd v kořenech semenáčků rajčat v rozsahu 0,1 - 1,5 mg/g suché váhy

rostlinného materiálu po 3-týdenní aplikaci roztoku Cd o koncentraci 1 - 100 μM (Dong *et al.*, 2006; Gaion *et al.*, 2017). Množství akumulovaného Cd významně závisí na aplikované koncentraci Cd a zvoleném způsobu růstu semenáčků rajčat. Se zvyšující se koncentrací Cd je v kořenech semenáčků rajčat akumulováno větší množství Cd. Pěstování semenáčků rajčat hydroponicky v živných roztocích snižuje akumulaci Cd, zatímco růst semenáčků rajčat na pevných médiích nebo v pevných zahradnických substrátech zvyšuje akumulaci Cd v kořenové části rostliny (Gaion *et al.*, 2016). Současně literatura uvádí, že byl pozorován pokles čerstvé váhy rostlinného materiálu v důsledku akumulace Cd (Gaion *et al.*, 2016). Prozatím se jedná o jedinou publikaci zabývající se vlivem akumulace Cd na čerstvou váhu semenáčků rajčat, tudíž publikované výsledky nemusí platit pro všechny genotypy rajčat. Pro tato tvrzení by bylo vhodné provést další výzkum zahrnující významné genotypy rajčete.

U semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur nebyla aktivita HO zvolenou metodou měřitelná ve vzorcích kořenových částí. Současně v rámci stanovení koncentrace BV v kořenových částech semenáčků kultivovaných na médiích s obsahem CdCl_2 nebyly zaznamenány změny hodnot koncentrací BV oproti kontrolní skupině. Stanovené koncentrace BV v kořenových částech semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur měly přibližnou hodnotu 10 ng/g, zatímco koncentrace BV v kořenových částech semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom byly desetkrát vyšší. Nízké koncentrace BV odpovídají nízkým aktivitám HO v kořenových částech semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur. Jedním z možných důvodů výrazného snížení aktivity HO v kořenových částech je regulace degradace hemu, a to za účelem omezení tvorby degradačních produktů (Balestrasse *et al.*, 2008). Potřeba BV není natolik vysoká v kořenových částech oproti nadzemní částem, kde je BV součástí syntetické dráhy fytochromů. Současně nízká potřeba BV jako antioxidantu v kořenových částech poukazuje na jiné obranné mechanismy vůči vlivu Cd, které mohly být v semenáčcích během 10-ti denní kultivace aktivovány. Literatura uvádí, že HO, jakožto enzym zapojený do antioxidačního systému rostlin, by měl při zvýšeném oxidačním stresu vyvolaném Cd vykazovat vyšší aktivitu (Balestrasse *et al.*, 2008). Jsou publikovány výsledky potvrzující zvýšení exprese HO do 48 hodin od aplikace Cd. Avšak po 72 hodinách od aplikace Cd je zaznamenán výrazný pokles exprese HO oproti kontrolní skupině, která je exprimována po celou dobu na stejné hladině. Tyto výsledky byly získány experimentem zabývajícím se vlivem Cd na kořeny

semenáčků sóji (Balestrasse *et al.*, 2008). Je možné, že v rámci našeho experimentu došlo na počátku kultivace na médiích s CdCl₂ k navýšení aktivity HO vlivem zvýšené exprese HO, ale po několika dnech mohlo dojít k prudkému poklesu HO a po ukončení 10-ti denní kultivace byla aktivita již neměřitelná. Aktivita HO u kontrolní skupiny mohla být snižována pomaleji než u skupin semenáčků kultivovaných na médiích s CdCl₂. Důvodem rychlého poklesu aktivity HO může být přetížení antioxidantního systému nebo vyvolání dalších obranných reakcí v důsledku zvýšené aktivity HO (Balestrasse *et al.*, 2008). Důvodem, proč byla aktivita HO měřena až po ukončení 10-ti denní kultivace a ne v kratších časových intervalech, tak jak uvádí literatura, je fakt, že v rámci experimentu se pracovalo s rostlinkami rajčat a tudíž působení Cd na aktivitu HO mohlo být jiné než u rostlinek sóji. Současně by pro stanovení aktivity HO v různých časových intervalech bylo potřeba napěstovat podstatně více rostlinného materiálu. Samotný experiment zabývající se stanovením vlivu abiotického stresu na více faktorů v jednotlivých vzorcích byl už sám o sobě velmi náročný na množství použitého rostlinného materiálu.

V rámci stanovení specifické aktivity ve vzorcích kořenových částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom a *S. lycopersicum* cv. Amateur byly získány odlišné výsledky. Pro kultivar MicroTom byla aktivita HO zvolenou metodou měřitelná, zatímco pro kultivar Amateur ne. Jedním z odůvodnění může být rozdílná citlivost kultivarů a současně přizpůsobení vývoje na přítomnost Cd v kultivačním médiu. Na základě dosažených výsledků lze kultivar MicroTom označit za více citlivý a hůře přizpůsobitelný na přítomnost Cd. Z toho důvodu je možné, že aktivita HO u kultivaru MicroTom byla udržována na vyšší hladině, aby se během vývoje nadále podílela na antioxidantních a obranných mechanismech semenáčků. Současně u kultivaru MicroTom byla měřena i aktivita HO v kořenových částech kontrolní skupiny, tudíž odlišné výsledky stanovení aktivity HO v kořenových částech obou kultivarů by mohly být důsledkem rozdílných úrovní exprese genu HO.

U vzorků nadzemních částí semenáčků *S. lycopersicum* cv. Amateur se výsledky stanovení specifické aktivity HO a koncentrace BV zcela neshodují. V rámci stanovení aktivity HO byl u semenáčků kultivovaných na médiích s CdCl₂ zaznamenán mírný pokles oproti kontrolní skupině. Naopak v rámci stanovení koncentrace BV byl u semenáčků kultivovaných na médiích s CdCl₂ zaznamenán mírný nárůst oproti kontrolní

skupině. Je možné, že vlivem působení vyšších koncentrací CdCl₂ došlo k rychlejší aktivaci exprese genu HO, což vedlo k vyšší produkci BV. Následně mohlo dojít k dřívějšímu poklesu aktivity HO a zvýšená koncentrace BV nestačila být rostlinou metabolizována. Tato hypotéza je podpořena literaturou, kde byl zaznamenán dřívější pokles exprese HO vlivem působení vyšší koncentrace Cd (Balestrasse *et al.*, 2005; Balestrasse *et al.*, 2008). Vlivem působení 200 µM Cd došlo ke snížení exprese HO už po 48 hodinách od aplikace, zatímco vlivem působení 50 µM Cd až po 72 hodinách od aplikace (Balestrasse *et al.*, 2008). Možným odůvodněním pro stanovení nižších koncentrací BV ve vzorcích nadzemních částí oproti vzorkům kořenových částí je využití BV pro syntézu fytochromů.

Na základě dosažených výsledků by bylo pro další experimenty vhodné stanovit aktivitu HO také po kratší době kultivace na médiích s CdCl₂, jelikož aktivita HO se během dlouhodobější kultivace může opět snižovat k hodnotám kontrolních rostlin. Výsledky z experimentů vypovídají o krátkodobém zapojení HO do antioxidantního systému, kde je zapojena do tvorby signálu, který dále působí. Oxidační stres vyvolá zvýšenou expresi HO, která se prostřednictvím degradačních produktů hemu podílí na antioxidantních a signalizačních drahách vedoucích k aktivaci dalších obranných reakcí. V důsledku krátkodobého zapojení HO do antioxidantního systému dochází v průběhu delších časových intervalů ke snížení aktivity HO na nízkou hladinu, která zajistí pouze potřebné množství degradačních produktů hemu pro rostlinu, a to z toho důvodu, že další významné obranné mechanismy jsou již aktivní a není již třeba signálu pro jejich aktivaci. Současně by bylo vhodné provést i stanovení obsahu Cd v rostlinném materiálu, které by potvrdilo akumulaci Cd.

V rámci stanovení peroxidace lipidů byl v kořenových částech semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom a *S. lycopersicum* cv. Amateur kultivovaných na médiích s CdCl₂ zaznamenán pokles obsahu MDA oproti kontrolní skupině. Tento jev může být vysvětlen zvýšeným působením antioxidantního systému vlivem abiotického stresu. Literatura uvádí, že vlivem působení 200 µM Cd byl zaznamenán nárůst koncentrace MDA po 48 hodinách od aplikace (Balestrasse *et al.*, 2005). Je možné, že k navýšení produkce MDA v případě našeho experimentu došlo, ale současně v průběhu kultivace mohly semenáčky aktivovat metabolické dráhy odbourání MDA. Semenáčky si také mohly v důsledku dlouhodobé kultivace vytvořit obranný mechanismus, který zabránil

další zvýšené peroxidaci lipidů. Tato tvrzení souhlasí s výsledky uvedenými v publikaci Dong *et al.*, 2006. V této publikaci autoři nejprve zaznamenali po 7 dnech kultivace s Cd nárůst koncentrace MDA, ovšem po 14 dnech kultivace s Cd byl již zaznamenán pokles koncentrace MDA v důsledku jeho degradace. Na procesu degradace MDA se podílí skupina enzymů aldehyddehydrogenas (Sunkar *et al.*, 2003). Zároveň byl zaznamenán vliv zvyšujících se koncentrací aplikovaného Cd na obsah MDA. Dřívější publikace uvádí, že v rámci skupin vzorků koncentrace MDA úměrně vzrostla v důsledku 7-denní expozice stoupajícím koncentracím Cd. Vyšší obsah MDA je pomaleji metabolizován, což se projevilo pomalejším poklesem koncentrace MDA po 14 dnech u skupin vzorků vystavených vyšším koncentracím Cd (Dong *et al.*, 2006). Tyto informace potvrzují, že vyšší koncentrace Cd způsobují vyšší nárůst lipidové peroxidace, která způsobuje poškození buněčných membrán vedoucích k narušení buněčných funkcí. Tento fakt se výrazně projevil u kořenů semenáčků obou kultivarů kultivovaných s 500 μM CdCl₂. Tuto koncentraci lze označit pro oba použité kultivary semenáčků *S. lycopersicum* za toxickou. Aplikované koncentrace CdCl₂ byly porovnány s koncentracemi uvedenými v diskutované literatuře. Jako nejvyšší aplikovaná koncentrace na semenáčky sóji se uvádí koncentrace 200 μM (Balestrasse *et al.*, 2005; Balestrasse *et al.*, 2008). Publikace zaměřené na vliv Cd na rostlinky rajčat uvádí jako nejvyšší aplikovanou koncentraci 100 μM (Hasan *et al.*, 2015; Gaion *et al.*, 2017).

V nadzemních částech semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom a *S. lycopersicum* cv. Amateur nebyly zaznamenány výrazné změny v obsahu MDA oproti kontrolním skupinám. Může být předpokládán stejný trend jako pro kořenové části, kdy nejprve došlo k mírnému navýšení produkce MDA, které bylo následně metabolizováno, což způsobilo pokles na hodnoty blízké kontrolním skupinám. Současně ale nelze vyloučit možnost slabší peroxidace lipidů po celou dobu kultivace, která se projevila nízkými hladinami MDA, které byly blízké hodnotám MDA kontrolních skupin.

Na expozici Cd reaguje každý kultivar *S. lycopersicum* zcela odlišně. Rozdílnost je v toleranci Cd, spuštění a účinnosti obranných mechanismů. V literatuře se uvádí, že tolerance vůči těžkým kovům je dána schopností se vyrovnat s ROS a schopnost akumulace těžkých kovů je dána spuštěním silné exprese proteinů vázajících kovové ionty (DalCorso *et al.*, 2013). Současně se dále uvádí, že významné je i snížení exprese genů majících vliv na odolnost vůči chorobám (Plessl *et al.*, 2010). Srovnáním

dosažených výsledků u semenáčků *S. lycopersicum* cv. MicroTom a *S. lycopersicum* cv. Amateur bylo zjištěno, že *S. lycopersicum* cv. Amateur byl více tolerantní vůči přítomnosti CdCl₂ během svého vývoje. Vysvětlením odlišné tolerance může být právě rozdílná náchylnost k napadení patogenem, který je původcem rostlinných chorob (Plessl *et al.*, 2010). Na základě této informace může být dosažený výsledek provedených experimentů vysvětlen tak, že *S. lycopersicum* cv. Amateur je k napadení vysoce náchylný, tudíž exprese genů zodpovídajících za odolnost vůči biotickému stresu není za běžných podmínek vysoká a v případě abiotického stresu je snadné ji rychle snížit. V důsledku toho je rostlina schopna rychlé aktivace obranných mechanismů, kterými se brání proti působení abiotického stresu. Naopak *S. lycopersicum* cv. MicroTom je vůči napadení patogenem středně rezistentní. To znamená, že exprese genů zodpovídajících za odolnost vůči biotickému stresu je za běžných podmínek vyšší než u předchozího kultivaru. V případě působení abiotického stresu je tedy nutno snížit podstatně silnější expresi obranných mechanismů vůči stresu biotickému. Tento proces trvá déle, rostlina se působení abiotickému stresu brání na nižší úrovni a je tak více vystavena jeho škodlivým vlivům.

6 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše shrnující funkce biliverdinu u rostlin a jeho známé dráhy biosyntézy a přeměny. Dále byla vypracována literární rešerše zabývající se antioxidační úlohou biliverdinu ve stresových podmínkách. Současně byl vypracován přehled metodiky pro stanovení biliverdinu.

Nejvýznamnějšími výstupy praktické části diplomové práce týkající se biliverdinu a hemoxygenasy:

- Byla testována reaktivita BV s látkami uvolňujícími RNS *in vitro*, kdy významnější reakce byla na rozdíl od dříve publikovaných výsledků pozorována pouze v případě donoru nitroxylu Angeliho soli.
- Byla zavedena a testována metoda fluorimetrické kvantifikace BV, kterou však v důsledku nízké citlivosti metody nelze použít pro analýzu BV v extraktech rajčete.
- S využitím syntetického standardu BV byla zavedena a optimalizována vysoce citlivá UHPLC-MS/MS metoda pro kvantitativní analýzu BV ve vzorcích nadzemní a kořenové části semenáčků rajčete. Kalibrace zavedené UHPLC-MS/MS metody byla provedena také s využitím deuteriem-značeného standardu BV-d₄.
- Optimalizovaná UHPL-MS/MS metoda analýzy BV byla aplikována pro vzorky kořenových a nadzemních částí rajčat, ve kterých byl stanoven obsah BV na úrovni nM koncentrace.
- Byla pozorována stabilita zásobních roztoků standardu BV. Z experimentu bylo zjištěno, že zásobní roztok standardu BV je stabilní v mrazícím boxu při -20°C po dobu 14 dnů.
- Byl pozorován pozitivní účinek heminu na aktivitu HO, obsahu BV ve vzorcích kořenových částí a počet postranních kořenů u semenáčků *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom.
- V důsledku vlivu abiotického stresu na semenáčky *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom byly zaznamenány významné změny ve vývoji semenáčků v důsledku aplikace CdCl₂ v 50, 100, 200 a 500 μM koncentraci, zatímco pro

kultivar *Amateur* byly zaznamenány významné změny až v důsledku aplikace CdCl_2 v 500 μM koncentraci.

- Vliv abiotického stresu na aktivitu HO a obsah BV nebyl u semenáčků *Solanum lycopersicum* cv. *MicroTom* jednoznačný. Změny aktivit HO nebyly doprovázeny významnými změnami obsahu BV ve vzorcích kořenových i nadzemních částí semenáčků. Pro kultivar *Amateur* byla aktivita HO měřitelná pouze v nadzemních částech, zatímco obsah BV byl změřen ve vzorcích kořenových i nadzemních částí. Odlišné výsledky stanovení pro oba kultivary mohou být důsledkem rozdílné odolnosti kultivarů na stresové podmínky.
- Byl potvrzen vliv abiotického stresu na peroxidaci lipidů, kdy byly zaznamenány významné změny peroxidace pro oba kultivary ve vzorcích kořenových částí.

Pro metodu stanovení interakce BV s RNS by bylo vhodné otestovat reakční prostředí o různém složení za účelem studia vlivu reakčního prostředí na průběh reakce. V budoucnu by měla být provedena validace zavedené UHPLC-MS/MS metody analýzy BV za využití deuteriem-značeného standardu BV- d_4 . Pro další experimenty vlivu abiotického prostředí se nabízí detailnější prozkoumání vlivu aplikace CdCl_2 na aktivitu HO, obsah BV a peroxidaci lipidů v kratších časových intervalech zavedenými experimentálními metodami. Současně by bylo vhodné stanovit množství Cd akumulovaného rostlinou jak v kořenové, tak nadzemní části rostliny. Vhodnou metodou pro takové stanovení by byla plamenová atomová absorpční spektrometrie.

7 LITERATURA

- Adachi T., Ishikawa K., Hida W., Matsumoto H., Masuda T., Date F., Ogawa K., Takeda K., Furuyama K., Zhang Y., Kitamura T., Ogawa H., Maruyama Y., Shibahara S. (2004): Hypoxemia and blunted hypoxic ventilatory responses in mice lacking heme oxygenase-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320**: 514-522.
- Andel, F., Hasson, K. C., Gai, F., Anfinrud, P. A., and Mathies, R. A. (1997): Femtosecond time-resolved spectroscopy of the primary photochemistry of phytochrome. *Biospectroscopy* **3**: 421-433.
- Anzaldi L. L. a Skaar E. P. (2010): Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infection and Immunity* **78**: 4977-4989.
- Balestrasse K.B., Noriega G.O., Batlle A., Tomaro M.L. (2005): Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in Soybean nodules. *Free Radical Research* **39**: 145-151.
- Balestrasse K.B., Yannareli G.G., Noriega G.O., Batlle A., Tomaro M.L. (2008): Heme oxygenase and catalase gene expression in nodules and roots of soybean plants subjected to cadmium stress. *Biometals* **21**: 433-441.
- Baranano D.E., Rao M., Ferris C.D., Snyder S.H. (2002): Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **99**: 16093-19098.
- Balk J. a Schaedler T.A. (2014): Iron cofactor assembly in plants. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 125-153.
- Cao Z., Geng B., Xu S., Xuan W., Nie L., Shen W., Liang Y., Guan R. (2011): *BnHO1*, a haem oxygenase-1 gene from *Brassica napus*, is required for salinity and osmotic stress-induced lateral root formation. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4675-4689.
- Chemspider home page: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16739950.html> (17.10.2017).
- Chemspider home page: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.26332335.html?rid=1b6d6c40-b905-46d7-afbc-13e13442fe5b&page_num=0 (19.1.2018).
- Chen Y.-H., Chao Y.-Y., Hsu Y.Y., Hong C.-Y., Kao C.H. (2012): Heme oxygenase is involved in nitric oxide- and auxin-induced lateral root formation in rice. *Plant Cell Reports* **31**: 1085-1091.
- Chepelev L.L., Beshara C.S., MacLean P.D., Hatfield G.L., Rand A.A., Thompson A., Wright J.S., Barclay L.R.C. (2006): Polypyrrroles as antioxidants: Kinetic studies on reactions of bilirubin and biliverdin dimethyl esters and synthetic model compounds with peroxy radicals in solution. Chemical calculations on selected typical structures. *Journal of Organic Chemistry* **71**: 22-30.
- Chiabrando D., Vinchi F., Fiorito V., Mercurio S., Tolosano E. (2014): Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Frontiers in Pharmacology* **5**: 61 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3986552/>.
- Cunningham O., Dunne A., Sabido P., Lightner D., Mantle T.J. (2000): Studies on the specificity of the tetrapyrrole substrate for human biliverdin-IX α reductase and biliverdin-IX β reductase. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 19009-19017.
- Cuypers A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Opdenakker K., Nair A.R., Munters E., Artois T.J., Nawrot T., Vangronsveld J., Smeets K. (2010): Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals* **23**: 927-940.
- DalCorso G., Fasani E, Furini A. (2013): Recent advances in the analysis of metal hyperaccumulation and hypertolerance in plants using proteomics. *Frontiers in Plant Science* **4**: 280 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3724048/>.
- Davis S., Bhoo S.H., Durski A.M., Walker J.M., Viersta R.D. (2001): The heme oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant Physiology* **126**: 656-669.

- Dong J, Wu F., Zhang G. (2006): Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* **64**: 1659-1666.
- Duchefa home page: <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0222> (19.4.2018).
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F. (1998): Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 10328-10333.
- Elich T.D., McDonagh A.F., Palma L.A., Lagarias J.C. (1989): Phytochrome chromophore biosynthesis. Treatment of tetrapyrroled deficient Avena explants with natural and non natural bilatrienes leads to formation of spectrally active holoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 183-189.
- Emborg T.J., Walker J.M., Noh B., Vierstra R.D. (2006): Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**: 856-868.
- Evans A.M., DeHaven C.D., Barrett T., Mitchell M., Milgram E. (2009): Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Analytical Chemistry* **81**: 6656-6667.
- Fang T., Li J., Cao Z., Chen M., Shen W., Huang L. (2014): Heme oxygenase-1- is involved in sodium hydrosulfide-induced lateral root formation in tomato seedlings. *Plant Cell Reports* **33**: 969-978.
- Florczyk U., Golda S., Zieba A., Cisowski J., Jozkowicz A., Dulak J. (2011): Overexpression of biliverdin reductase enhances resistance to chemotherapeutics. *Cancer Letters* **300**: 40-47.
- Furuya M. a Schäfer E. (1996): Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes. *Trends in Plant Science* **1**: 301-307.
- Gaion L.A., Lorevice P.G., Monteiro C.C., Gavassi M.A., D'Amico-Damião V., Gratão P.L., Gasparino E.C., Carvalho R.F. (2017): The role of phytochromes in cadmium stress responses in tomato. *Bragantia* **77**: 1 <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.2016417>.
- Gardikas C., Kench J.E., Wilkinson J.F. (1950): Bile pigment precursors in normal human erythrocytes. *Biochemical Journal* **46**: 85-88.
- Gohya T., Zhang X., Yoshida T., Migita C.T. (2006): Spectroscopic characterization of a higher plant heme oxygenase isoform-1 from *Glycine max* (soybean): coordination structure of the heme complex and catabolism of heme. *FEBS journal* **273**: 5384-5399.
- Gonzalez-Sanchez E., Perez M.J., Nytofte N.S., Briz O., Monte M.J., Lozano E., Serrano M.A., Marin J.J.G. (2016): Protective role of biliverdin against bile acid-induced oxidative stress in liver cells. *Free Radical Biology and Medicine* **97**: 466-477.
- Gray C.H., Kulczycka A., Nicholson D.C. (1972): The photodecomposition of bilirubin and other bile pigments. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **3**: 288-294.
- Hasan M.K., Ahammed G.J., Yin L., Shi K., Xia X., Zhou Y., Yu J., Zhou J. (2015): Melatonin mitigates cadmium phytotoxicity through modulation of phytochelatin biosynthesis, vacuolar sequestration, and antioxidant potential in *Solanum lycopersicum* L. *Frontiers in Plant Science* **6**: 601 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531246/>.
- Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **4**: 604-611.
- Heinemann I. U., Jahn M., Jahn D. (2008): The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **474**: 238-251.
- Hughes M.N. (1999): Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**: 263-272.
- Ikonomou M.G., Blades A.T., Kebarle P. (1991): Electrospray-ion spray. A comparison of mechanisms and performance. *Analytical Chemistry* **63**: 1989-1998.

- Iwamori S., Sato E., Saigusa D., Yoshinari K. Ito S., Sato H., Takahashi N. (2015): A novel and sensitive assay for heme oxygenase activity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **309**: F667-F671 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224716>.
- Jansen T. a Daiber A. (2012): Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase? *Frontiers in Pharmacology* **3**: 30 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306014/>.
- Kaur H., Hughes M.N., Green C.J., Naughton P., Foresti R., Motterlini R. (2003): Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Letters* **543**: 113-119.
- Klemz R., Mashreghi M.-F., Spies C., Volk H.-D., Kotsch K. (2009): Amplifying the fluorescence of bilirubin enables the real-time detection of heme oxygenase activity. *Free Radical Biology and Medicine* **46**: 305-311.
- Klouda P. (2003): *Moderní analytické metody*. 2.vydání, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, Česká republika, 132 stran.
- Kohchi T., Mukougawa K., Frankenberg N., Masuda M., Yokota A., Lagarias J.C. (2001): The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin dependent biliverdin reductase. *The Plant Cell* **13**: 425-436.
- Krishnamurthy P., Xie T., Schuetz J.D. (2007): The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacology & Therapeutics* **114**: 345-358.
- Kühn H. a Thiele B.J. (1999): The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Letters* **449**: 7-11.
- Lagarias, J. C., a Rapoport, H. (1980): Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the PR form of the phytochrome chromophore. *Journal of the American Chemical Society* **102**: 4821-4828.
- Lebeda A., Mieslerová B., Petřivalský M., Luhová L., Špundová M., Sedlářová M., Nožková-Hlaváčková V., Pink D.A.C. (2014): Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. *European Journal of Plant Pathology* **138**: 569-596.
- Lightner D.A., Holmes D.L., McDonagh A.F. (1996): On the acid dissociation constants of bilirubin and biliverdin. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 2397-2405.
- Lin Y.-T., Li M.-Y., Cui W.-T., Lu W., Shen W.-B. (2012): Haem Oxygenase-1 is involved in hydrogen sulfide-induced cucumber adventitious root formation. *Journal of Plant Growth Regulation* **31**: 519-528.
- Lipton S. A., Choi Y. B., Pan Z. H., Lei S. Z., Chen H. S., Sucher N. J., Loscalzo J., Singel D. J., Stamler J. S. (1993): A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**: 626-632.
- Liu J.G., Liang J.S., Li K.Q., Zhang Z.J., Yu B.Y., Lu X.L., Yang J.C., Zhu Q.S. (2003): Correlations between cadmium and mineral nutrients in absorption and accumulation in various genotypes of rice under cadmium stress. *Chemosphere* **52**: 1467-1473.
- MacLean P.D., Chapman E.E., Dobrowolski S.L., Thompson A., Barclay L.R.C. (2008): Pyrroles as antioxidants: Solvent effects and the nature of the attacking radical on antioxidant activities and mechanisms of pyrroles, dipyrinones, and bile pigments. *Journal of Organic Chemistry* **73**: 6623-6635.
- Maghzal G.J., Leck M.C., Collinson E., Li C., Stocker R. (2009): Limited role for the bilirubin-biliverdin redox amplification cycle in the cellular antioxidant protection by biliverdin reductase. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 29251-29259.
- Maines M.D. (1988): Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB Journal* **2**: 2557-2568.
- Maines M.D. a Kappas A. (1975): Cobalt stimulation of heme degradation in the liver. Dissociation of microsomal oxidation of heme from cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry* **250**: 4171-4177.
- Marilena G. (1997): New physiological importance of two classic residual products: carbon monoxide and bilirubin. *Biochemical and Molecular Medicine* **61**: 136-142.

- Martelanc M., Žibera L., Passamonti S., Franko M. (2016): Application of high-performance liquid chromatography combined with ultra-sensitive thermal lens spectrometric detection for simultaneous biliverdin and bilirubin assessment at trace levels in human serum. *Talanta* **154**: 92-98.
- Matsumoto F., Obayashi T., Sasaki-Sekimoto Y., Ohta H., Takamiya K.I., Masuda T. (2004): Gene expression profiling of the tetrapyrrole metabolic pathway in Arabidopsis with a mini-array system. *Plant Physiology* **135**: 2379-2391.
- McDonagh A.F. (2010): The biliverdin–bilirubin antioxidant cycle of cellular protection: Missing a wheel? *Free Radical Biology and Medicine* **49**: 814-820.
- McNally S.J., Ross J.A., Garden O.J., Wigmore S.J. (2004): Optimization of the paired enzyme assay for heme oxygenase activity. *Analytical Biochemistry* **332**: 398-400.
- Mikulčák J., Klimeš B., Široký J., Šůla V., Zemánek F. (2013): *Tabulky matematické, fyzikální a chemické*. 4.vydání, Prometheus, spol. s r.o., Praha, Česká republika, 206 stran.
- Motterlini R., Foresti R., Bassi R., Green C.J. (2000): Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **28**: 1303-1312.
- Muramoto T., Kohchi T., Yokota A., Hwang I., Goodman H.M. (1999): The Arabidopsis photomorphogenic mutant *hyl* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *The Plant Cell* **11**: 335–348.
- Muramoto T., Tsurui N., Terry M.J., Yokota A., Kochi T. (2002): Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required to phytochrome chromophore synthesis. *Plant Physiology* **130**: 1958-1966.
- Neff M.M., Fankhauser C., Chory J. (2000): Light: an indicator of time and place. *Genes and Development* **14**: 257-271.
- Neuzil J. a Stocker R. (1993): Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters* **331**: 281-284.
- Nytofte N.S., Serrano M.A., Monte M.J., Gonzalez-Sanchez E., Tumer Z., Ladefoged K., Briz O., Marin J.J. (2011): A homozygous nonsense mutation (c.214C->A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis. *Journal of Medical Genetics* **48**: 219-225.
- Otterbein L.E. a Choi A.M. (2000): Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology - Lung Cellular nad Molecular Physiology* **279**: 1029-1037.
- Otterbein L.E., Bach F.H., Alam J., Soares M., Tao Lu H., Wysk M., Davis R.J., Flavell R.A., Choi A.M.K. (2000): Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine* **6**: 422-428.
- Papenbrock J. a Grimm B. (2001): Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis: studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta* **213**: 667-681.
- Pascolo L., Ferneti C., Garcia-Mediavilla M.V., Ostrow J.D., Tiribelli C. (2001): Mechanisms for the transport of unconjugated bilirubin in human trophoblastic BeWo cells. *FEBS Letters* **495**: 94-99.
- Plessl M., Rigola D., Hassinen V.H., Tervahauta A., Kärenlampi S., Schat H., Aarts M.G.M., Ernst D. (2010): Comparison of two ecotypes of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. PRESL) at the transcriptional level. *Protoplasma* **1-4**: 81-93.
- Ponka P. (1999): Cell biology of heme. *The American Journal of the Medical Sciences* **318**: 241-256.
- Pubchem home page:
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sodium_hydrosulfide#section=Top
 (16.4.2018).
- Quail P.H. (2002): Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**: 85-93.
- Quail P.H., Boylan M.T., Parks B.M., Short T.W., Xu Y., Wagner D. (1995): Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**: 675-680.

- Roy-Chowdhury J. (1996): Bilirubin metabolism and its disorders. In: *Hepatology. A Textbook of Liver Disease*. vol. 1, 3rd ed., (Zakim D. a Boyer T.D.), Saunders, Philadelphia, 323–361.
- Rudhe C., Clifton R., Chew O., Zemam K., Richter S., Lamppa G., Whelan J., Glaser E. (2004): Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* **343**: 639–647.
- Sedlak T.W. a Snyder S.H. (2004): Bilirubin benefits: Cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics* **113**: 1776-1782.
- Shah K., Kumar R.G, Verma S., Dubey R.S. (2001): Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* **161**: 1135-1144.
- Sharma S.S. a Dietz K.-J. (2008): The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* **14**: 1360-1385.
- Shekhawat G.S. a Verma K. (2010): Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2255-2270.
- Sigma-Aldrich home page: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical-applications/hplc/hplc-analysis-of-bilirubin-and-biliverdin-g002490.html> (4.11.2017).
- Sigma-Aldrich home page: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/30891?lang=en®ion=CZ> (15.4.2018).
- Silva-Filho M.C. (2003): One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 589–595.
- Silvestrini M., Mardegan A., Kamath R., Madou M., Moretto L.M., Passamonti S., Scopece P., Ugo P. (2014): Pyrolyzed photoresist carbon electrodes in aprotic solvent: Bilirubin electrochemistry and interaction with electrogenerated superoxide. *Electrochimica Acta* **147**: 401-407.
- Smith H. (1995): Physiological and ecological functions with the phytochrome family. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 269-315.
- Smulik R., Debski D., Zielonka J., Michalowski B., Adamus J., Marcinek A., Kalyanaraman B., Sikora A. (2014): Nitroxyl (HNO) reacts with molecular oxygen and forms peroxynitrite at physiological pH. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 35570-35581.
- Solar I., Dulitzky J., Shaklai N. (1990): Hemin-promoted peroxidation of red cell cytoskeletal proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **283**: 81-89.
- Stevens B. a Small R.D. (1976): The photoperoxidation of unsaturated organic molecules-XV.O₂¹Δ_g quenching by bilirubin and biliverdin. *Photochemistry and Photobiology* **23**: 33–36.
- Stocker R., Yamamoto Y., Mc Donagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. (1987): Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**: 1043-1046.
- Stocker R. (1990): Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radical Research Communications* **9**: 101-112.
- Sunkar R., Bartels D., Kirch H.-H. (2003): Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal* **35**: 452-464.
- Tenhunen R., Marver H., Schmid R. (1968): The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **61**: 748-755.
- Terry M.J., Linley P.J., Kohchi T. (2002): Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochemical Society Transactions* **30**: 604-609.
- Verma K., Shekhawat G.S., Sharma A., Mehta S.K., Sharma V. (2008): Cadmium induced oxidative stress and changes in soluble and ionically bound cell wall peroxidase activities in seedling and 3-4 leaf stage plants of *Brassica juncea* (L.) czern. *Plant Cell Reports* **27**: 1261-1269.
- Vítek L., Sedláčková L, Branny P., Ruml T. (2003): Metabolismus bilirubinu a způsobů eliminace jeho toxicity. *Chemické listy* **97**: 24-28.

- Wikipedia home page: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Fotosenzor> (11.10.2017).
- Wikipedia home page: <https://en.wikipedia.org/wiki/Heme> (20.1.2018).
- Xuan W., Zhu F.-H., Xu S. Huang B.-K., Ling T.-F., Qi J.-Y., Ye M.-B., Shen W.-B. (2008): The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process. *Plant Physiology* **148**: 881-893.
- Yamaguchi T. a Nakajima H. (1995): Changes in the composition of bilirubin-IX isomers during human prenatal development. *European Journal of Biochemistry* **233**: 467-472.
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S. (1999): An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science* **4**: 128-129.
- Zhang H., Tang J., Liu X.-P., Wang Y., Yu W., Peng W.-Y., Fang F., Ma D.-F., Wei Z.-I., Hu L.-Y. (2009): Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**: 1086-1094.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

- AS - Angeliho sůl
- BSA - hovězí sérový albumin
- BR - bilirubin
- BV - biliverdin
- BVR - biliverdinreduktasa
- DEA-NO - diethylamino-NONOát
- DMSO - dimethylsulfoxid
- HEPES - 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
- HO - hemoxygenasa
- HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- HSP - protein teplotního šoku
- MDA - malondialdehyd
- MS - hmotnostní spektrometrie
- NADPH - redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
- ROS - reaktivní formy kyslíku
- RNS - reaktivné formy dusíku
- SNAP - S-nitroso-N-acetylpenicillamin
- SNP- nitroprusid sodný
- UHPLC-MS/MS - ultravysokotlaká kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií